

TESE DE DOUTORAMENTO

**Efectos biológicos *in vivo* e *in vitro*  
tras la exposición combinada de  
radiofrecuencias empleadas en  
dispositivos móviles de  
telecomunicaciones.**

Alberto López Furelos

ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL

PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA EN MEDICINA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

MMXVIII

## DECLARACIÓN DO AUTOR DA TESE

### EFFECTOS BIOLÓGICOS IN VIVO E IN VITRO TRAS LA EXPOSICIÓN COMBINADA DE RADIOFRECUENCIAS EMPLEADAS EN DISPOSITIVOS MÓVILES DE TELECOMUNICACIONES.

D. Alberto López Furelos

Presento a miña tese, seguindo o procedemento axeitado ao Regulamento, e declaro que:

- 1) A tese abarca os resultados da elaboración do meu traballo.
- 2) De selo caso, na tese faise referencia ás colaboracións que tivo este traballo.
- 3) A tese é a versión definitiva presentada para a súa defensa e coincide coa versión enviada en formato electrónico.
- 4) Confirmo que a tese non incorre en ningún tipo de plaxio doutros autores nin de traballos presentados por min para a obtención doutros títulos.

*En Santiago de Compostela., 23 de xullo de 2018*

Asdo. Alberto López Furelos

## AUTORIZACIÓN DO DIRECTOR

EFFECTOS BIOLÓGICOS IN VIVO E IN VITRO TRAS LA EXPOSICIÓN  
COMBINADA DE RADIOFRECUENCIAS EMPLEADAS EN DISPOSITIVOS  
MÓVILES DE TELECOMUNICACIONES.


Dña. María Elena López Martín

INFORMA:

*Que a presente tese, correspóndese co traballo realizado por D. **Alberto López Furelos**, baixo a miña dirección, e autorizo a súa presentación, considerando que reúne os requisitos esixidos no Regulamento de Estudos de Doutoramento da USC, e que como director desta non incorre nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.*

*En Santiago de Compostela, 23 de xullo de 2018*

Asdo. María Elena López Martín

A large, light blue watermark of the USC logo is oriented diagonally across the page. The logo consists of the letters 'USC' in a large, stylized font, with the text 'UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA' written in a smaller font below it.

*“Si no conozco una cosa,  
la investigaré”*

**LOUIS PASTEUR**





## AGRADECIMIENTOS

Esta tesis doctoral se ha realizado bajo la dirección de la prof. <sup>a</sup> titular de Anatomía Humana María Elena López Martín a quien me gustaría expresar mi más profundo agradecimiento por permitirme realizar este trabajo, en el cual me instruyó y me dedicó su paciencia y su tiempo para que saliese de manera exitosa.

Al catedrático de Microbiología y Parasitología Jose Manuel Leiro Vidal, en cuyo laboratorio realicé gran parte de la experimentación de esta tesis, le agradezco sinceramente por proporcionarme siempre su consejo y ayuda cuando la necesité.

Al catedrático Francisco José Ares Pena que nos guió en la parte física de este trabajo y nos brindó la tecnología para llevar a cabo los experimentos que de otra forma serían imposibles de realizar sin su ayuda

Al Dr. Aarón Ángel Salas Sánchez, gracias a su trabajo y dedicación pudimos llevar a buen término las publicaciones que han resultado de la investigación de esta tesis.

A Rafa y Rogelio, por aportar su experiencia, conocimientos y ayuda, y también por su grata compañía que hizo más amenas las horas de espera durante las radiaciones.

A Isabel, que se tomó la paciencia de enseñarme y ayudarme a dominar las primeras técnicas de laboratorio que realicé al iniciar este proyecto.

A Rosa Ana, que encontró el tiempo para ayudarme a aprender nuevas técnicas ya cuando la investigación de esta tesis estaba más avanzada.

A toda la gente que conocí en los diferentes laboratorios en los que investigué y que supieron darme un consejo o brindarme su ayuda cuando lo necesité.

A mis padres, que me animan a aprender cada día más, que siempre me apoyan y me toleran, y sin cuya presencia no podría haber llegado hasta aquí.

A la gente que conocí a lo largo de la realización de la carrera de biología, a los amigos que hice durante el máster y nos nuevos que descubrí durante la realización de este doctorado.



## RESUMEN

La exposición simultánea a múltiples señales electromagnéticas es una realidad de la vida diaria, pero, sus efectos sobre la salud son poco conocidos. No existen evidencias que demuestren que la respuesta biológica bajo múltiples radiofrecuencias sea distinta a la respuesta a una única señal de radiofrecuencia y tampoco existen datos que expliquen los posibles mecanismos de acción de varias señales de radiación al interactuar con el tejido vivo. El objetivo de esta tesis doctoral fue el de explorar los efectos y mecanismos biológicos tras la exposición a radiación de frecuencias múltiples en los seres vivos.

Para determinar la diferencia en los efectos, se ha realizado un estudio experimental con ratas de laboratorio y con una línea celular de macrófagos expuestos a la radiación de una o dos señales combinadas de radiofrecuencia a 900 y 2450 MHz en una cámara de ensayos electromagnéticos GTEM. Se utilizaron niveles de SAR subtérmicos en todos los casos y tiempos de exposición de hasta 72 horas.

En un modelo experimental de rata macho, se analizaron de forma independiente las modificaciones tisulares y los cambios apoptóticos en los núcleos celulares, así como los niveles preapoptóticos de caspasa 3 y el nivel estrés celular mediante las proteínas Hsp90 y Hsp70 en cerebro y cerebelo. En la línea celular de macrófagos RAW 264.7, se examinó la viabilidad y crecimiento celular, se hicieron estudios de estrés oxidativo, valorando los niveles de óxido nítrico, de citoprotección, cuantificando las proteínas de estrés celular térmico (Hsp70), y de la función antiinflamatoria (TNF $\alpha$ ) y fagocítica.

La ausencia de daño tisular apreciable en los tejidos periféricos contrasta con estrés térmico celular producido en la corteza cerebral y en el cerebelo de rata, no pudiendo ser este explicado por la acción aditiva de ambas señales. El incremento en la actividad inflamatoria, citoprotectora, citotóxica y la disminución de la actividad fagocítica macrofágica después de la exposición continuada y combinada de ambas radiofrecuencias, indicaron una potencial disfuncionalidad en la respuesta inmunitaria en el modelo experimental murino, que debe de

ser investigada con mayor profundidad para evaluar el riesgo de estas radiaciones electromagnéticas a nivel humano. Nuestros resultados indicaron que los efectos subtérmicos de la combinación de dos frecuencias constituyen un biosistema en el que no existe una relación causa/efecto lineal.



## RESUMO

A exposición simultánea a múltiples sinais electromagnéticos é unha realidade da vida cotiá, pero os seus efectos sobre a saúde son pouco coñecidos. Non existen evidencias que amosen que a resposta biolóxica baixo múltiples radiofrecuencias sexa distinta á resposta a un único sinal de radiofrecuencia e tampouco existen datos que expliquen os posibles mecanismos de acción de varios sinais de radiación o interactuar co tecido vivo. O obxectivo desta tese doctoral foi o de explorar os efectos e mecanismos biolóxicos tras a exposición a radiación de frecuencias múltiples nos seres vivos.

Para determinar a diferenza nos efectos, realizouse un estudo experimental con ratas de laboratorio e cunha liña celular de macrófagos expostos á radiación dun ou dous sinais combinados de radiofrecuencia a 900 e 2450 MHz nunha cámara de ensaios electromagnéticos GTEM. Empregaronse niveis de SAR subtermicos en todos os casos e tempos de exposición de ata 72 horas.

Nun modelo experimental de rato macho, analizaronse de xeito independente as modificacións tisulares e os cambios apoptóticos nos núcleos celulares, así como os niveis preapoptóticos de caspasa 3 e o nivel de estrés celular mediante as proteínas Hsp90 e Hsp70 no cerebro e cerebelo. Na liña celular de macrófagos RAW 264.7, examinouse a viabilidade eo crecemento celular, fixéronse estudos de estrés oxidativo, valorándose os niveis de óxido nítrico, citoprotección, cuantificando as proteínas de estrés celular térmico (Hsp70) e de función antiinflamatoria (TNF $\alpha$ ) e fagocítica.

A ausencia de dano tisular apreciable nos tecidos periféricos contrasta co estrés térmico celular producido no cortex cerebral e no cerebelo da rata, non podendo ser explicado pola acción aditiva de ambos sinais. O incremento na actividade inflamatoria, citoprotectora, citotóxica e a diminución da actividade fagocítica dos macrófagos despois da exposición continuada e combinada de ambas radiofrecuencias, indicaron unha potencial disfuncionalidade na resposta inmunitaria no modelo experimental murino, que debe ser

investigado con maior profundidade para avaliar o risco destas radiacións electromagnéticas a nivel humano. Os nosos resultados indicaron que os efectos subtérmicos da combinación de dúas frecuencias constitúen un biosistema no que non existe unha relación de causa / efecto lineal.



## ABSTRACT

The simultaneous exposure to multiple electromagnetic signals is a reality of daily life, but its effects on health are little known. There is no evidence to show that the biological response under multiple radiofrequencies is different from the response to a single radiofrequency signal and there are no data that explain the possible mechanisms of action of several radiation signals when interacting with living tissue. The objective of this doctoral thesis was to explore the effects and biological mechanisms after exposure to radiation of multiple frequencies in living beings.

To determine the difference in effects, an experimental study was performed with laboratory rats and with a cell line of macrophages exposed to the radiation of one or two combined radiofrequency signals at 900 and 2450 MHz in a GTEM electromagnetic test chamber. Sublethal SAR levels were used in all cases and exposure times of up to 72 hours.

In an experimental model of male rat, tissue modifications and apoptotic changes in cell nuclei were independently analyzed, as well as the preapoptotic levels of caspase 3 and the cell stress level by Hsp90 and Hsp70 proteins in brain and cerebellum. In the macrophage cell line RAW 264.7, cell viability and growth were examined, oxidative stress studies were carried out, assessing nitric oxide levels, cytoprotection, quantifying thermal cellular stress proteins (Hsp70), and anti-inflammatory function. (TNF $\alpha$ ) and phagocytic.

The absence of appreciable tissue damage in the peripheral tissues contrasts with cellular thermal stress produced in the cerebral cortex and in the rat cerebellum, which can not be explained by the additive action of both signals. The increase in inflammatory, cytoprotective and cytotoxic activity and the decrease in macrophage phagocytic activity after the continuous and combined exposure of both radiofrequencies, indicated a potential dysfunctionality in the immune response in the experimental murine model, which should be investigated with greater depth to assess the risk of these electromagnetic radiations at the human



level. Our results indicated that the sub-thermal effects of the combination of two frequencies constitute a biosystem in which there is no linear cause / effect relationship.



# ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. GENERALIDADES.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. CARACTERÍSTICAS DE LAS ONDAS ELECTROMAGNÉTICAS.....</b>	<b>2</b>
1.2.1. Parámetros de las ondas electromagnéticas.....	2
1.2.2. Tipos de radiaciones electromagnéticas según su frecuencia o longitud de onda. El espectro electromagnético. ....	3
1.2.3. Caracterización de los campos electromagnéticos de radiofrecuencia.....	4
<b>1.3. INTERACCIÓN DE LA RADIACIÓN NO IONIZANTE CON LOS TEJIDOS BIOLÓGICOS. ....</b>	<b>5</b>
1.3.1. Efectos biológicos de la radiación electromagnética sobre los tejidos. Efectos térmicos, atérmicos y no térmicos. ....	5
1.3.2. Cuantificación de la energía absorbida de la radiación no ionizante por la materia viva: el SAR.....	7
1.3.2.1. Cálculo del SAR de manera experimental. ....	8
1.3.2.2. Cálculo del SAR mediante el método FDTD.....	10
<b>1.4. NORMATIVA RELATIVA A LOS CAMPOS ELECTROMAGNÉTICOS... </b>	<b>10</b>
1.4.1. Límites de exposición. ....	11
1.4.1.2. Valores de SAR locales.....	12
1.4.2. Cambios en la ley 2004/40/CE. ....	13
1.4.3. Efectos microtérmicos.....	14
<b>1.5. ESTUDIO DE LOS EFECTOS BIOLÓGICOS MEDIANTE SISTEMAS EXPERIMENTALES DE RADIACIÓN.....</b>	<b>14</b>

<b>1.5.1. Principales modelos experimentales “<i>in vivo</i>” utilizados para el estudio de los efectos de radiofrecuencia en humanos o animales.</b>	15
1.5.1.1 Medida de la temperatura rectal como indicador de estrés térmico.	16
<b>1.5.2. Principales modelos experimentales “<i>in vitro</i>” utilizados para el estudio de los efectos de radiofrecuencia a nivel celular.</b>	17
<b>1.5.3. Comparación de los modelos experimentales “<i>in vivo</i>” e “<i>in vitro</i>”.</b>	18
<b>1.5.4. Las Proteínas de choque térmico (Hsp) como herramienta para el estudio de estrés celular provocado por la radiación no ionizante.</b>	19
1.5.4.1. Hsp70.	20
1.5.4.2. Hsp90.	21
<b>1.5.5. Producción de estrés oxidativo por la exposición a radiaciones no ionizantes.</b>	23
1.5.5.1. Producción de óxido nítrico.	24
<b>1.5.6. Estudios relacionados con la apoptosis.</b>	26
1.5.6.1. Caspasa-3.	28
1.5.6.2. TNF- $\alpha$ .	28
1.5.6.3. Interacción de la Hsp70 con las vías apoptóticas.	29
<b>1.5.7. Efectos biológicos por la interacción de una Radiofrecuencia.</b>	30
1.5.7.1. Efectos en el tejido nervioso.	30
1.5.7.2. Efectos en el Sistema reproductor.	31
1.5.7.3. Efectos en el Sistema inmune.	32
1.5.7.4. Efectos en el Sistema muscular.	33
1.5.7.5. Efectos en el Tejido adiposo.	33
<b>1.5.8. Efectos biológicos por la interacción multi-frecuencia.</b>	33

<b>II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....</b>	<b>39</b>
<b>2.1. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>39</b>
<b>2.2. OBJETIVOS.....</b>	<b>38</b>
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
<b>3.1. DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA EXPERIMENTAL DE RADIACIÓN.....</b>	<b>42</b>
<b>3.1.1. Características del dispositivo de radiación <i>in vivo</i>. ....</b>	<b>45</b>
3.1.1.1. Protocolo de exposición in vivo .....	45
3.1.1.2. Medición de la temperatura rectal mediante sonda termométrica. ....	45
3.1.1.3. Descripción de las simulaciones.....	46
<b>3.1.2. Características del dispositivo de radiación <i>in vitro</i> .....</b>	<b>46</b>
3.1.2.1. Desarrollo de un sistema de termorregulación automática..	46
3.1.2.2. Dosimetría de la línea celular RAW 264.7.....	49
3.1.2.3. Protocolo de exposición in vitro.....	49
<b>3.2. MATERIAL PARA CULTIVOS CELULARES <i>IN VITRO</i>.....</b>	<b>50</b>
<b>3.2.1. Medios de cultivo.....</b>	<b>50</b>
<b>3.2.2. Subcultivo.....</b>	<b>50</b>
<b>3.3. OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE TEJIDOS Y CÉLULAS.....</b>	<b>51</b>
<b>3.3.1. Eutanasia de los Animales .....</b>	<b>51</b>
<b>3.3.2. Extracción del tejido y preparación para estudios de                 morfología .....</b>	<b>51</b>
3.3.2.1. Inclusión en Parafina. ....	51
3.3.2.2. Cortes de Tejidos.....	52
<b>3.3.3. Extracción y preparación del tejido para ELISA.....</b>	<b>52</b>
<b>3.3.4. Preparación de células para citometría de flujo.....</b>	<b>52</b>
<b>3.3.5. Extracción del ARNm. ....</b>	<b>53</b>
<b>3.3.6. Extracción de sobrenadante celular. ....</b>	<b>53</b>

3.3.7. Preparación del ensayo de actividad fagocítica. ....	53
3.4. TÉCNICAS DE TINCIÓN. ....	53
3.4.1. Tinción con Hematoxilina-Eosina. ....	54
3.4.2. Tinción de los núcleos con DAPI. ....	54
3.4.3. Tinción de la línea RAW 264.7 con Giemsa para el ensayo de actividad fagocítica. ....	54
3.5. TÉCNICA DE ELISA.....	55
3.6. ESTUDIO DE LA VIABILIDAD Y CURVA DE CRECIMIENTO .....	56
3.7. PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO .....	56
3.8. DETECCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE HSP70 Y TNF- $\alpha$ . ....	57
3.9. CUANTIFICACIÓN Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS. ....	58
3.9.1. Análisis de los resultados mediante Microscopía óptica. ....	58
3.9.1.1. Análisis cualitativo de los tejidos teñidos mediante HE.....	58
3.9.1.2. Análisis cualitativo, cuantificación y análisis estadístico de los tejidos teñidos con DAPI. ....	58
3.9.1.3. Cuantificación y análisis estadístico de la actividad Fagocítica. ....	59
3.9.2 Análisis estadístico de los datos de temperatura rectal. ....	59
3.9.3. Cuantificación y análisis estadístico de los datos de ELISA. ....	59
3.9.4. Análisis de los datos de crecimiento y viabilidad celular. ....	60
3.9.5. Análisis de los datos de producción de óxido nítrico. ....	60
3.9.6. Análisis de los datos de PCR.....	61
3.10. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	61
3.10.1. Grupo experimental A: <i>Efectos agudos causados por la exposición a radiación de frecuencias combinadas en tejidos de rata Sprague-Dawley. Efectos morfológicos y de estrés celular.</i> .....	61

3.10.1.1. Experimento I: Un sistema experimental multi-frecuencia para estudiar la dosimetría y efectos agudos sobre la morfología celular y nuclear en tejidos de rata. ....	61
3.10.1.2. Experimento II: Evidencia del estrés celular y de la caspasa-3 resultante de una señal combinada de dos frecuencias en el cerebro y el cerebelo de ratas Sprague-Dawley. ....	62
<b>3.10.2. Grupo experimental B: <i>Efecto de la radiación repetida con exposición a multifrecuencias en la línea celular RAW 264.7.</i></b> .....	64
3.10.2.1. Experimento III: La exposición a la radiación de radio-frecuencias simples o combinadas provoca la disfunción de los macrófagos en la línea celular RAW 264.7. ....	64
<b>3.11. CONFLICTO DE INTERESES</b> .....	65
<b>IV. RESULTADOS</b> .....	66
<b>4.1. RESULTADOS DEL EXPERIMENTO I: <i>UN SISTEMA EXPERIMENTAL MULTI-FRECUENCIA PARA ESTUDIAR LA DOSIMETRÍA Y EFECTOS AGUDOS SOBRE LA MORFOLOGÍA CELULAR Y NUCLEAR EN TEJIDOS DE RATA.</i></b> .....	66
4.1.1. Estimación del SAR.....	67
4.1.2. Resultados histopatológicos.....	67
4.1.2.1. Secciones teñidas con hematoxilina-eosina. ....	67
4.1.2.2. Tinción de los núcleos mediante DAPI.....	73
<b>4.2. RESULTADOS DEL EXPERIMENTO II: <i>EVIDENCIA DEL ESTRÉS CELULAR Y DE LA CASPASA-3 RESULTANTE DE UNA SEÑAL COMBINADA DE DOS FRECUENCIAS EN EL CEREBRO Y EL CEREBELO DE RATAS SPRAGUE-DAWLEY.</i></b> .....	73
4.2.1. Simulación de la señal y cálculo SAR .....	74
4.2.2. Efectos de estrés medidos mediante cambios en la temperatura rectal post-radiación.....	75
4.2.3. Resultados de los inmunoensayos ELISA. ....	80
4.2.3.1. En la corteza cerebral. ....	80
4.2.3.2. En el cerebelo. ....	84

<b>4.3. RESULTADOS DEL EXPERIMENTO III: <i>LA EXPOSICIÓN A LA RADIACIÓN DE RADIO-FRECUENCIAS SIMPLES O COMBINADAS PROVOCA LA DISFUNCIÓN DE LOS MACRÓFAGOS EN LA LÍNEA CELULAR RAW 264.7.</i></b> .....	89
<b>4.3.1. Estudio del efecto de las RF sobre la viabilidad y la curva de crecimiento celular.</b> .....	90
<b>4.3.2 Efecto sobre la producción de óxido nítrico.</b> .....	90
<b>4.3.3 Análisis del efecto de las RF sobre expresión de los genes proinflamatorios Hsp70 y TNF-<math>\alpha</math>.</b> .....	91
4.3.3.1 Hsp70.....	91
4.3.3.2. TNF- $\alpha$ . .....	96
<b>4.3.4 Actividad fagocítica.</b> .....	96
<b>V. DISCUSIÓN</b> .....	102
<b>5.1. DISCUSIÓN DEL EXPERIMENTO I: <i>UN SISTEMA EXPERIMENTAL MULTI-FRECUENCIA PARA ESTUDIAR LA DOSIMETRÍA Y EFECTOS AGUDOS SOBRE LA MORFOLOGÍA CELULAR Y NUCLEAR EN TEJIDOS DE RATA.</i></b> .....	102
<b>5.2. DISCUSIÓN DEL EXPERIMENTO II: <i>EVIDENCIA DEL ESTRÉS CELULAR Y DE LA CASPASA-3 RESULTANTE DE UNA SEÑAL COMBINADA DE DOS FRECUENCIAS EN EL CEREBRO Y EL CEREBELO DE RATAS SPRAGUE-DAWLEY.</i></b> .....	105
<b>5.3. DISCUSIÓN DEL EXPERIMENTO III: <i>LA EXPOSICIÓN A LA RADIACIÓN DE RADIO-FRECUENCIAS SIMPLES O COMBINADAS PROVOCA LA DISFUNCIÓN DE LOS MACRÓFAGOS EN LA LÍNEA CELULAR RAW 264.7.</i></b> .....	110
<b>5.4. VALORACIONES FINALES.</b> .....	114
<b>VI. CONCLUSIONES</b> .....	117
<b>VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	119
<b>ANEXO I</b> .....	150
<b>ANEXO II</b> .....	152
<b>ANEXO III</b> .....	154

**ANEXO IV ..... 156**







# I. INTRODUCCIÓN

## 1.1. GENERALIDADES.

Los campos electromagnéticos (CEM) han estado presentes a lo largo de toda la evolución biológica en la tierra, procediendo de las fuentes naturales que constituyen el sol, las estrellas y otros cuerpos celestes altamente radiactivos. De hecho, el cuerpo humano genera como consecuencia de multitud de reacciones moleculares (cadena de transporte electrónico) y funciones fisiológicas (diferencia de potencial de membrana y conducción del impulso nervioso) CEM internos.

Sin embargo, con el desarrollo industrial de la civilización humana, se generaron nuevas fuentes de campos electromagnéticos. En primer lugar, aparecieron los de muy baja frecuencia (50 0 60 Hercios (Hz)) derivados del desarrollo de la red eléctrica y el uso de electrodomésticos, y más recientemente los de radiofrecuencia (de 100 kHz a 300 Gigahercios (GHz)) por el uso de dispositivos de telecomunicaciones.

La espectacular evolución de las telecomunicaciones en este siglo, ha generado en la sociedad un uso indiscriminado de dispositivos que emiten radiofrecuencia. Así en la actualidad, una gran parte de la población de los países desarrollados, poseen teléfonos inalámbricos. Este altísimo nivel de utilización trae como consecuencia una preocupación de las autoridades sanitarias sobre los efectos que podría causar en la salud de los ciudadanos. En actividades biológicas que ocurren en el cuerpo humano como la función cerebral y la conducción cardíaca hay una actividad eléctrica cuantificable, la exposición a fuentes eléctricas externas adversas puede interferir en la fisiología normal del sistema eléctrico humano. La exposición a ciertas frecuencias de radiación electromagnética puede además afectar a procesos fisiológicos con secuelas potenciales a largo plazo (Frey y col., 1994)

En los últimos años, estudios relacionados con disfunciones de tipo reproductivo, cáncer y afecciones del sistema nervioso central sugieren que la exposición a la radiación no ionizante causa un cierto riesgo para la salud. Es por ello que varias organizaciones internacionales como la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Agencia Internacional del cáncer han lanzado un llamamiento para que se realice una investigación más intensa sobre el impacto de la radiación no ionizante en la salud humana (Genuis S.J. y col., 2008).

## **1.2. CARACTERÍSTICAS DE LAS ONDAS ELECTROMAGNÉTICAS.**

La radiación electromagnética posee una dualidad onda-corpúsculo pudiendo actuar de dos maneras:

A) Actúa como una onda siguiendo las ecuaciones de Maxwell.

B) Actúa como un fotón cuya energía ( $E$ ) es directamente proporcional a la frecuencia de la onda ( $f$ ) multiplicada por la constante de Plank ( $h$ ).  $E = f \cdot h$

### **1.2.1. Parámetros de las ondas electromagnéticas.**

Se denomina radiación electromagnética a la constituida por ondas producidas por la oscilación de una carga eléctrica. Las ondas electromagnéticas presentan propiedades típicas del movimiento ondulatorio, en función de lo cual se pueden definir dos parámetros básicos:

➤ Frecuencia: número de oscilaciones o ciclos por segundo, cuya unidad de medida es el hercio o ciclo por segundo.

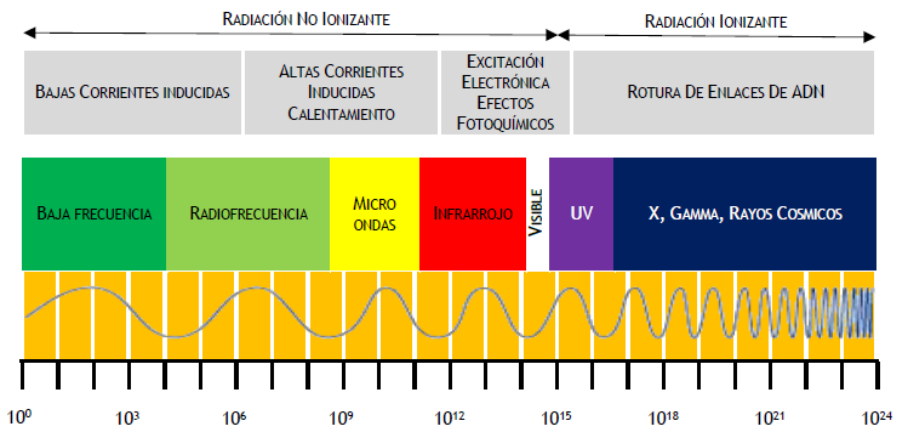
➤ Longitud de onda: inversamente proporcional a la frecuencia, expresando la distancia entre dos crestas adyacentes de la onda.

Por otra parte, es conocido el hecho de que todas las radiaciones electromagnéticas, independientemente de su frecuencia, se transmiten a la velocidad de la luz en el medio (siendo las únicas ondas que pueden propagarse por el vacío, sin necesidad de un medio físico). Conociendo pues, que la velocidad de la luz es una constante en las leyes que rigen el comportamiento de las ondas electromagnéticas, y sabiendo que la

frecuencia y la longitud son inversamente proporcionales, se expone la ecuación que relaciona los dos parámetros anteriores:  $\lambda=c/\sigma$ , donde  $\lambda$  es la longitud de la onda,  $c$  es la velocidad de la luz y  $\sigma$  es la frecuencia de la onda.

➤ Energía: cuya unidad de medida es el electrón-voltio (eV) (energía cinética que adquiere un electrón al ser acelerado por una diferencia de potencial de 1 voltio). Los efectos de la radiación al interactuar con un material serán tanto más importantes cuanto mayor sea la fuerza de impacto, es decir, cuanto más energética sea la radiación, y esto dependerá de su frecuencia (a mayor frecuencia, mayor energía y viceversa).

### 1.2.2. Tipos de radiaciones electromagnéticas según su frecuencia o longitud de onda. El espectro electromagnético.



**Figura 1.** Espectro electromagnético. Se observa que la energía es mayor a menor longitud de onda y viceversa.

El espectro electromagnético comprende todo el rango de ondas de naturaleza electromagnética, agrupándolas según frecuencia creciente o, lo que es lo mismo, longitud de onda decreciente. El espectro abarca los campos electromagnéticos desde las frecuencias más bajas, como los generados por las líneas de alta tensión (50 o 60 Hz), siguiendo por las ondas de radio subdivididas en diferentes frecuencias dependiendo

del ámbito de propagación, pasando por las microondas (comprendidas entre 300 MHz y 300 GHz), la luz visible en sus diferentes longitudes de onda (colores, por lo tanto) desde los 780 nm (rojo) hasta los 380 nm (violeta), la radiación ultravioleta desde los 380 nm hasta los 15 nm, los rayos X desde los 15 nm hasta los 0,1 nm, y por último los rayos  $\gamma$ , de longitudes de onda todavía más pequeñas. Las ondas emitidas por los teléfonos móviles, y en concreto las estudiadas en este trabajo a 900 MHz y 2,45 GHz, se incluyen dentro del rango de las microondas.

De manera general, se denominan campos electromagnéticos a aquellos que comprenden las radiaciones entre 0 y 300 GHz, y a su vez este rango se dividirá en:

- Campos electromagnéticos de muy baja frecuencia, entre 0 y 100 Kilohercios (KHz), localizándose aquí los campos electromagnéticos de frecuencia industrial (red eléctrica a 50 Hz en Europa y 60 Hz en EEUU).
- Radio frecuencia (RF), la zona del espectro comprendida entre los 100 KHz y los 300 GHz, a la que pertenecen las microondas, dentro de las cuales se incluyen las ondas emitidas por los teléfonos móviles actuales.

### **1.2.3. Caracterización de los campos electromagnéticos de radiofrecuencia.**

Una de las principales aplicaciones de la radiofrecuencia es la transmisión de información a distancia. Para ello es necesaria una transferencia de energía de un lugar a otro del espacio, de modo que las transmisiones por RF emplean campos electromagnéticos en el espacio libre, como soporte de energía. La información se configurará bajo la forma de variaciones temporales de dicho campo electromagnético, como es el caso de la modulación en frecuencia.

Las magnitudes básicas que definen un campo electromagnético en el espacio libre son dos magnitudes vectoriales: la intensidad del campo eléctrico inducido  $E$  expresado en Voltios por metro (V/m), y la intensidad del campo magnético inducido  $H$ , expresado en Amperios por metro (A/m). Por otra parte, la transferencia de energía del campo electromagnético se define por una magnitud vectorial, la densidad de potencia  $S = E \times H$  (W/m<sup>2</sup>), que es inversamente proporcional al cuadrado de la distancia a la antena y tiene la dirección de la línea de

visión de la antena. Cabe destacar que las intensidades de campo toman valores diferentes en cada punto del espacio y en cada instante (son funciones del espacio y el tiempo), cualidad que viene dada por la frecuencia y la longitud de onda.

Es importante precisar el hecho de que cualquier sistema radiante está compuesto por un generador de ondas y un elemento radiante o antena, y que las características del campo electromagnético generado difieren en un punto alejado de la antena de las características del campo en un punto próximo a la misma.

### **1.3. INTERACCIÓN DE LA RADIACIÓN NO IONIZANTE CON LOS TEJIDOS BIOLÓGICOS.**

Por encima del espectro de luz visible, las radiaciones  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , y rayos X poseen energía suficiente para que un fotón consiga arrancar un electrón al colisionar con un átomo (efecto fotoeléctrico) y como resultado se produce la ionización del átomo; a este proceso se le denomina radiación ionizante. La pérdida de estos electrones altera la estructura de los enlaces y se traduce en la creación de nuevas moléculas. La exposición a altas dosis de radiaciones ionizantes puede causar daños biológicos a los afectados, pudiendo ser desde quemaduras en la piel, caída del cabello, náuseas, enfermedades o incluso la muerte. A nivel macromolecular, la acción de las radiaciones ionizantes puede afectar a la estructura del ADN, dando lugar a aberraciones cromosómicas, incorrecta expresión del mensaje genético, mutaciones o muerte celular.

Los fotones con una energía menor a 0,1 eV no tienen energía suficiente para arrancar los electrones a los átomos y por tanto ionizarlos (radiación no ionizante), esto hace que estas radiaciones no sean un peligro para la integridad estructural de las moléculas. Se tratan de ondas electromagnéticas con una frecuencia inferior a  $10^{17}$  Hz (rayos ultravioletas tipo C). Aunque no son capaces de ionizar la materia estas radiaciones pueden generar otros efectos tales como la vibración de las moléculas o la aparición de corrientes de iones en las membranas.

#### **1.3.1. Efectos biológicos de la radiación electromagnética sobre los tejidos. Efectos térmicos, atérmicos y no térmicos.**

La frecuencia de las radiaciones no ionizantes determinara en gran medida el efecto sobre la materia o tejido radiado, los posibles efectos biológicos causados por la exposición a una radiofrecuencia se

clasifican en tres clases en función de sus características térmicas en el objetivo biológico, y de la capacidad de este de contrarrestar tales efectos a través de mecanismo termorreguladores; así los clasificamos en térmicos, atérmicos y no térmicos (Sebastián- Franco y col., 2006).

Todo cuerpo o sistema tiene una frecuencia característica, cuando un sistema es excitado a una frecuencia cercana a su frecuencia característica, da como lugar que sus moléculas vibren. Este movimiento hace que el material experimente un aumento de temperatura debido a que la energía cinética se transforma en calor (Challis y col., 2005). Cuando nos situamos sobre la frecuencia característica la tasa de absorción de energía es la máxima posible, esto da gran importancia a la frecuencia de la onda radiada. En el caso de los tejidos biológicos la frecuencia más importante es la de 2,45 GHz, que se trata de la frecuencia de resonancia del agua, que está presente en todos los procesos biológicos.

De manera convencional se consideran efectos térmicos aquellos en los que la energía absorbida por el organismo es la suficiente como para que se incremente la temperatura en  $0,1^{\circ}\text{C}$ . Si el aumento de la temperatura es mayor de  $1^{\circ}\text{C}$  puede provocar alteraciones fisiológicas y bioquímicas de los tejidos afectados, tales como hipertermia leve o severa, alteraciones en el desarrollo embrionario, abortos, cataratas y quemaduras superficiales o profundas (ICNIRP, 1996; Guy y col., 1975). Cuando el aumento de la temperatura corporal es menor a  $1^{\circ}\text{C}$ , el cuerpo tiene mecanismos de disipación de calor mediante el sistema sanguíneo, aunque en aquellos tejidos poco vascularizados las proteínas corren el riesgo de desnaturalizarse pudiendo generar daños irreversibles. También se han encontrado efectos que no están directamente relacionados con el aumento de la temperatura tisular (Dawe y col., 2006; Banik y col., 2003).

Los efectos atérmicos, son aquellos que, aun aumentando la temperatura corporal, los sistemas reguladores de los tejidos impiden que esta elevación sea superior a  $0,1^{\circ}\text{C}$ . Los efectos biológicos observados por este tipo de radiación son principalmente inducir corrientes eléctricas que pueden estimular las células nerviosas y musculares.

En cuanto a los efectos no térmicos, se consideran cuando la radiofrecuencia no tiene la energía suficiente como para producir un aumento de la temperatura, aun en ausencia de mecanismos

termorreguladores (Challis, 2005). Aun así, existen numerosos estudios experimentales en los cuales los efectos biológicos no parecen estar atribuidos al calentamiento de los tejidos, pudiendo haber alteraciones fisiológicas de naturaleza atérmica (Banik y col., 2003)

En esta tesis hablamos de efectos atérmicos y no térmicos para referirnos a las radiaciones que no producen una elevación de temperatura detectable.

### **1.3.2. Cuantificación de la energía absorbida de la radiación no ionizante por la materia viva: el SAR.**

El SAR (Specific Absorption Rate), cuantifica la energía absorbida en vatios por unidad de masa de tejido en kg (w/kg) en un tiempo determinado. Esta medida es el índice biológico que utiliza la legislación para fijar las restricciones permitidas de radiación o campos electromagnéticos en los seres vivos. La dosimetría es por tanto la determinación de la energía absorbida por un cuerpo expuesto a una radiación. La cantidad de radiación que absorben los organismos depende de:

- Los parámetros del campo incidente, esto es, la frecuencia, su polarización o la disposición del objeto respecto al campo.
- Las características del cuerpo radiado, es decir, su geometría interna y externa, así como las propiedades dieléctricas de los tejidos (conductividad y permitividad). Estas propiedades dependen en gran medida de las moléculas que constituyen los objetos. En los sistemas biológicos la molécula fundamental es el agua, aunque la mayoría de los tejidos difieren en este contenido de agua y de otras moléculas que pueden ser afectadas por el campo, reflejando así unos valores de permitividad y conductancia diferentes. En general se puede decir que cuanto mayor sea el contenido en agua del tejido mayor será su absorción.
- Los efectos que provocan otros objetos que afectan al campo, efectos de tierra y de reflexión. En un organismo la mayor parte de la radiación es reflejada por la piel lo que implica que la mayor parte de la energía no penetra en la piel.



Para determinar la interacción de la radiofrecuencia con los tejidos resulta imprescindible describir los siguientes parámetros:

- La densidad de corriente inducida en los tejidos.
- La intensidad de campo eléctrico.
- El SAR.

La fórmula matemática empleada para el cálculo del SAR es la siguiente:

$$\text{SAR} = \sigma \times E_t^2 \times \rho^{-1}$$

Siendo  $E_t$  el campo en el tejido (V/m),  $\sigma$  la conductividad eléctrica del tejido (S/m) y  $\rho$  la densidad del tejido ( $\text{Kg/m}^3$ ).

La dosimetría es de vital importancia cuando se realizan estudios con animales pequeños. Por ejemplo, la energía media absorbida por unidad de masa en una rata a 2,45 GHz es diez veces superior a la absorbida por un adulto de tamaño medio en las mismas condiciones.

#### 1.3.2.1. Cálculo del SAR de manera experimental.

Para medir experimentalmente los valores locales de SAR se puede seguir 2 procedimientos:

- Medir la intensidad del campo eléctrico, la conductividad eléctrica y la densidad del tejido
- Medir las variaciones de temperatura. Este es el método más usado y al que nos vamos a referir a continuación.

Para realizar la medida de las variaciones de temperatura experimentalmente, se usa de forma común un fantoma. Un fantoma es un material sintético que tiene unas propiedades eléctricas equivalentes a las del tejido biológico real que se quiere medir.

A nivel experimental es importante definir dos magnitudes de SAR:

- El SAR promediado sobre el cuerpo entero, es un valor único que representa la magnitud de SAR promedio de todo el cuerpo expuesto a la radiofrecuencia.

- El SAR local, es el valor de SAR en una pequeña porción del cuerpo expuesto a la radiofrecuencia.

Para determinar el SAR promediado sobre el cuerpo entero, se emplean calorímetros en forma de vaso en los cuales se introduce agua y un fantoma o el cadáver del animal de interés. El SAR se determina, tras la exposición a radiofrecuencias, a partir de la transferencia de calor que se produce entre el objeto y el agua.

Para determinar el SAR local y la intensidad del campo eléctrico en un punto, se emplea una sonda de campo eléctrico o una sonda térmica implantada en el tejido o fantoma. Las propiedades térmicas de los fantomas determinarán con qué rapidez la difusión térmica producirá cambios en los patrones de temperatura del material. Las sondas de campo eléctrico poseen antenas situadas en las tres direcciones del espacio para obtener medidas que permitan conocer la polarización del campo eléctrico. La longitud de cada una de las antenas, permite añadir sensibilidad o resolución espacial según posean mayor o menor longitud respectivamente. Las sondas térmicas utilizan sensores basados en termistores (resistencias variables con la temperatura) que permiten determinar cambios de temperatura de 0,01 °C en tejidos biológicos. Pueden provocar algunos inconvenientes, como alterar el campo eléctrico con su presencia, dar medidas erróneas por el efecto de deriva térmica (el aumento de temperatura produce un aumento de la energía absorbida retroalimentándose) o por efecto de las pérdidas térmicas entre el fantoma y el ambiente.

Además de las sondas, hay numerosas técnicas para la medida del SAR dentro de un plano tridimensional. La lámina de cristal líquido, que permite obtener información de la distribución de temperaturas mediante la inserción de la lámina en uno de los planos del objeto mientras se radia. La cámara termográfica de infrarrojos, que permite obtener la medida de miles de puntos al mismo tiempo después de exponer el fantoma durante un breve período de tiempo y cortarlo en el plano deseado. O la técnica de imágenes por resonancia magnética que proporciona la distribución de temperaturas dentro del cuerpo de forma no invasiva.

#### 1.3.2.2. Cálculo del SAR mediante el método FDTD.

La obtención de los valores de SAR experimentalmente es un método laborioso que solo representa las condiciones físicas del fantoma ideal, existe un método que combina los valores experimentales y el sistema computacional FDTD (Finite Difference Time Domain). Este es el método que usamos para calcular los valores de SAR durante la realización de los experimentos.

Inicialmente, el método FDTD se basó en una estandarización del SAR para todo el cuerpo (Kunz y col., 1993), los softwares actuales permiten el cálculo de los valores de los campos electromagnéticos y estimar el SAR en los diferentes tejidos en función de la potencia suministrada mediante la digitalización anatómica de una modelo animal (Schmid & Partner Engineering AG., 2009).

Para realizar este método, la imagen total del fantoma se construye a base de cortes seriados tomados mediante resonancia magnética del sujeto de estudio. Mediante el software basado en FDTD, los cuerpos se dividen en capas de poliedros que representan las diferentes estructuras y tejidos. Los datos obtenidos se almacenan en una base de datos que permite el manejo de toda esta información de manera rápida. Las simulaciones realizadas mediante este programa permiten discriminar entre diferentes tejidos distinguiendo tales como: cerebro, huesos, músculos, grasa, piel, corazón, pulmones, sistema digestivo, hígado, riñones, testículos (machos) o el útero (hembras), ojos, nariz y otras regiones.

Todo ello permite ver dimensionalmente, en un rango de colores; los valores de SAR en cada parte del cuerpo de una forma muy clara (López-Martín y col., 2017).

### 1.4. NORMATIVA RELATIVA A LOS CAMPOS ELECTROMAGNÉTICOS

Atendiendo a los efectos biológicos conocidos y producidos por los campos de radiofrecuencia sobre la materia viva, diversas comisiones de expertos han elaborado, basándose en la evidencia experimental disponible, límites de exposición que son empleados para la elaboración de las actuales normativas de seguridad de aplicación a nivel nacional e internacional. De este modo, la OMS encargó a la Comisión internacional de Protección contra las Radiaciones no Ionizantes (ICNIRP, sus siglas en inglés) la elaboración de unas normas para la protección a la exposición a radiaciones no ionizantes. Las

recomendaciones sobre seguridad elaboradas por la ICNIRP sirven, así mismo, de base para la “Recomendación del Consejo Europeo de 12 de julio de 1999, sobre la limitación de la exposición del público en general a los campos electromagnéticos (0 Hz a 300 GHz) -1999/519/EEC”. A su vez, las recomendaciones del Consejo Europeo son la base para la publicación en España del Real Decreto 1066/2001, de 28 de septiembre, actualmente en vigor, por el que se aprueba el reglamento que establece condiciones de protección del dominio público, restricciones a las emisiones radioeléctricas y medidas de protección sanitarias frente a emisiones radioeléctricas.

Actualmente la norma vigente es la directiva europea 2013/35/UE sobre CEM publicada el 26 de junio de 2013 que sustituye a la directiva europea 2004/40/CE publicada en 2004.

El Real Decreto 299/2016 transpuso al derecho español la directiva 2013/35/UE sobre las disposiciones mínimas de salud y seguridad relativas a la exposición a campos electromagnéticos.

### **1.4.1. Límites de exposición.**

Para la aplicación de las restricciones basadas en los posibles efectos de las emisiones radioeléctricas sobre la salud, se han de diferenciar las restricciones básicas que marca la legislación en relación a los niveles de referencia a la exposición a CEM.

Las normas básicas son restricciones de la exposición a los campos radioeléctricos basadas directamente en los efectos de la exposición aguda a corto plazo, antes que, en la exposición a largo plazo, ya que la información disponible sobre los efectos a la exposición de los CEM a largo plazo es considerada insuficiente para establecer límites cuantitativos.

La unidad de medida de restricción básica varía dependiendo de la frecuencia del campo, siendo el SAR la más apropiada para los campos de radiofrecuencia dentro del rango de las microondas. Todos los valores de SAR establecidos como restricciones básicas están promediados para un período de 6 minutos y se refieren a SAR absorbidos por 10 g de tejido.

Características de la exposición.	SAR promedio en todo el cuerpo (W/Kg)	SAR localizado cabeza y tronco (W/Kg)	SAR localizado extremidades (W/Kg)
Exposición ocupacional	0,4	10	20
Exposición al público en general	0,08	2	4

**Tabla 1.** Restricciones básicas para exposiciones a campos electromagnéticos y magnéticos para frecuencias de 10 MHz-10GHz (ICNIRP, 1998).

Los niveles de referencia, se basan en las restricciones básicas y se obtienen realizando mediciones o extrapolaciones matemáticas de resultados experimentales. Estos niveles permiten una evaluación de la exposición al ser comparados con valores medidos en el ambiente, y están expresados en medidas de fácil cuantificación, generalmente densidad de potencia ( $\text{W/m}^2$ ). Las cuantificaciones de los niveles de referencia están promediadas sobre un área de  $10 \text{ cm}^2$  de superficie y para un período de  $68/f^{1.05}$  minutos ( $f$  = frecuencia en GHz).

Para el establecimiento de las restricciones básicas y los correspondientes niveles de referencia, los expertos evalúan resultados de diferentes estudios experimentales realizados en animales, a partir de los cuales se determinó el valor del SAR que provocaba un incremento de  $1^\circ\text{C}$  en la temperatura de un tejido corporal, valor que fue dividido entre 10 para establecer los límites de seguridad ocupacional, y a su vez reducido de nuevo, dividiéndose entre 5, para establecer los valores para el público.

#### 1.4.1.2. Valores de SAR locales

Durante el cálculo del SAR en determinadas localizaciones como el ojo o a nivel intracraneal pueden observarse niveles de SAR locales más elevados, de modo que ciertos estudios sugieren niveles locales máximos de SAR en el cerebro por encima de  $2 \text{ W/Kg}$  (restricción básica establecida por la ICNIRP) (Dimbylow and Mann, 1994; Burkhard y col., 1997; Bernardi y col., 2000). De cualquier forma, la mayoría de autores convienen que incluso en tales circunstancias la termorregulación ejercida por la perfusión a nivel cerebral, evita un

incremento de temperatura superior al rango de 0,03 – 0,19 °C, dependiendo del estudio (Anderson and Joyner, 1995; Van Leeuwen y col., 1999; Wang y Fujiwara, 1999; Bernardi y col., 2000; Wainwright, 2000; Gandhi y col., 2001).

#### 1.4.2. Cambios en la ley 2004/40/CE.

En principio la norma se iba a publicar en el 2012, este aplazamiento permitió a la Comisión presentar una nueva propuesta y adoptar una nueva directiva basada en datos más recientes y rigurosos. Las principales novedades introducidas son las siguientes:

- La presente Directiva no aborda los posibles efectos a largo plazo de la exposición a campos electromagnéticos, ya que actualmente no existen datos científicos comprobados que establezcan un nexo causal.
- La introducción de los llamados “niveles de actuación” para los riesgos de seguridad. Con “niveles de actuación” se refiere a los niveles de campo en los cuales no deberían aparecer efectos adversos para la salud en condiciones normales de trabajo y para personas no incluidas en los grupos de riesgo.
- Proponer un marco de excepciones para los valores límites vinculantes en las aplicaciones médicas que utilizan la resonancia magnética y las fuerzas armadas.
- Permitir la superación temporal de los límites de exposición en situaciones específicas, mediante el establecimiento de un marco controlado de excepciones para la industria.

Características de la exposición.	Intensidad de campo eléctrico, E (V/m)	Densidad de flujo magnético, B (μT)	Densidad de potencia (en W/m <sup>2</sup> )
Exposición ocupacional	140	0,45	50

**Tabla 2.** Niveles de actuación para exposiciones a campos eléctricos y magnéticos para frecuencias de 6-300 GHz (Directiva 2013/35/UE).

- Reforzar la protección de los grupos de riesgo, tales como las trabajadoras embarazadas y trabajadores

portadores de implantes, mediante la introducción de disposiciones especiales para estos casos.

➤ Establecer medidas complementarias, tales como la elaboración de una guía práctica no vinculante.

### **1.4.3. Efectos microtérminos**

Existen efectos que se producen bajo intensidades mucho menores que aquellas que producen efectos térmicos. Se considera que la absorción de energía bajo 0,08 W/kg para la población general y bajo 0,4 W/kg para los trabajadores no estaría produciendo efectos térmicos. Sin embargo, bajo esos niveles se pueden estar produciendo efectos por mecanismos microtérminos.

Entre los efectos microtérminos se describe la percepción auditiva de las ondas de radar. Se piensa que estas radiaciones producen elevaciones de temperatura muy rápidas pero muy débiles (10-6 °C en un microsegundo) (Chou, 1985). Pueden generarse también efectos indirectos, por ejemplo, corrientes eléctricas en implantes metálicos en el organismo, que causan molestias o bien alteran el funcionamiento de estos aparatos (por ejemplo, marcapasos). Se considera que la mayoría de los efectos descritos más arriba, como el aumento de la mortalidad por diversos tipos de cáncer bajo el efecto de radiaciones electromagnéticas de diverso tipo, tanto las de muy baja frecuencia (50 Hz), como las de frecuencias mayores (radiofrecuencias y frecuencias de microondas), son inducidos por mecanismos no térmicos.

### **1.5. ESTUDIO DE LOS EFECTOS BIOLÓGICOS MEDIANTE SISTEMAS EXPERIMENTALES DE RADIACIÓN.**

La valoración de las implicaciones de los posibles efectos de las radiaciones no ionizantes no puede hacerse sin tener en cuenta el hecho de que la identificación de una respuesta biológica no implica directamente la existencia de un efecto perjudicial para la salud. Así, los sistemas biológicos responden a estímulos externos de diversa naturaleza, y lo hacen siguiendo patrones fisiológicos de respuesta que permiten al sistema relacionarse con su medio y adaptarse a este de forma equilibrada.

Estas respuestas normales son ejemplos de efectos biológicos. Algunos efectos, por el contrario, pueden ser nocivos, pero en muchos casos las repercusiones que aquellos pudieran tener sobre la salud son



irrelevantes o, simplemente, indeterminadas. Por consiguiente, para los agentes químicos o físicos capaces de provocar en humanos respuestas significativas, su consideración de peligrosos o inocuos habrá de ser determinada en función de las características de la respuesta.

Los mecanismos biofísicos implicados en estas respuestas todavía no han sido identificados adecuadamente. Los estudios en modelos animales no han dejado claro los posibles efectos de estos campos sobre la homeostasis celular.

Para llevar a cabo estudios experimentales en animales sobre los efectos de la radiofrecuencia, se han diseñado sistemas de radiación. El diseño de estos sistemas es complicado ya que intervienen multitud de parámetros a veces difíciles de controlar (Swicord y col., 1999).

Recientemente, en nuestro grupo de investigación se ha diseñado un sistema experimental de exposición a radiofrecuencia que permite la medida de la potencia absorbida del animal en las regiones de interés, de forma controlada (López-Martín y col., 2008) en el que se ha estudiado en un modelo subconvulsivo con picrotoxina distintos parámetros fisiológicos de actividad cerebral (López-Martín y col., 2006; 2009; Carballo-Quintás y col., 2011).

En el caso de este estudio se empleó un sistema de radiación Schaffner 250 GTEM que permite radiar simultáneamente con dos frecuencias distintas (900 MHz y 2,45 GHz) (López-Furelos y col., 2012).

### **1.5.1. Principales modelos experimentales “*in vivo*” utilizados para el estudio de los efectos de radiofrecuencia en humanos o animales.**

La realización de la experimentación animal de esta tesis doctoral tuvo lugar durante el año 2012, el protocolo de experimentación animal y los permisos fueron obtenidos en base al RD1201/2005 vigente en ese momento. El 1 de febrero del año 2013 entró en vigor el RD53/2013 que sigue vigente hasta el momento.

Los animales que se utilizan habitualmente en estudios sobre los efectos de radiaciones electromagnéticas en los seres vivos, son roedores de laboratorio (ratas y ratones) (Albert y col., 1988; Chou y col., 1985; Hae-June y col., 2010; Kim y col., 2008). Se cuenta con un importante conjunto de conocimientos científicos sobre el desarrollo comparativo del sistema nervioso central en los roedores y en los seres



humanos. Todas las principales estructuras cerebrales de los seres humanos están presentes en los roedores y tienen funciones bastante similares. En general, la secuencia del desarrollo cerebral es comparable entre las especies, aunque los tiempos son bastante distintos. También existen precedentes de investigación en radiaciones no ionizantes en monos, conejos, lombrices o moscas entre otros (Adair y col., 1980; Hirata y col., 2010; Bourdineaud y col., 2017; Zhang y col., 2016; de Pomerai y col., 2000).

Por estas razones, los científicos creen que la investigación experimental en animales brinda una alternativa sólida y datos sobre los cuales los asesores de riesgo pueden basar sus opiniones.

En cuanto a los estudios epidemiológicos en humanos, los CEM se han identificado como un contaminante que pueden causar una gran variedad de efectos adversos a la salud como asma, diabetes, esclerosis múltiple, leucemia, electro-hipersensibilidad y sueño y trastornos del comportamiento, entre otros (Genuis y col., 2012; Hardell y col., 2008; IARC, 2002). En el perfil de población deberá considerarse la viabilidad de estudios de grupos de población sometidos a niveles de exposición elevados y bien definidos (como las de los trabajadores), así como por la mayor susceptibilidad a los CEM por personas que padecen enfermedades preexistentes como es el ejemplo del Parkinson, el Alzheimer o la epilepsia (Umarao y col., 2016; Campdelacreu, 2014; López-Martín y col., 2006). El diseño de este tipo de estudios puede verse facilitado por la existencia de registros de poblaciones muy expuestas.

El diseño de los estudios epidemiológicos deberá incluir en muchos casos población infantil en sus cohortes, y considerar variables que puedan ser más o menos específicas de ese grupo de población (Erkut y col., 2016; Bellieni y col., 2017).

En el 2012 la OMS publicó un manual recogiendo donde además de recoger los resultados diversos estudios sobre cáncer, marcaba unas pautas en las que podrían basarse futuros estudios tanto *in vivo* como *in vitro* (IARC., 2013).

#### 1.5.1.1 Medida de la temperatura rectal como indicador de estrés térmico.

La medida de la temperatura rectal, es un indicador útil de las posibles elevaciones de la temperatura producidas por la absorción de

la radiación electromagnética. Las lecturas rectales son afectadas por la profundidad de la medición, condiciones que afectan el flujo de sangre local y la presencia de materia fecal.

Los cambios de la temperatura rectal son lentos con respecto a los cambios de la temperatura central, por ejemplo, persiste elevada después de que la temperatura central empieza a caer y viceversa. Por lo tanto, una elevación aguda de la temperatura, se mantendría incluso después de su compensación. Puede establecerse una relación 1:1 entre la temperatura del recto y la del cerebro (D'Andrea y col., 1985).

En los seres humanos, una elevación de la temperatura ( $1^{\circ}\text{C}$ - $2^{\circ}\text{C}$ ) resultante de la absorción de energía puede ser uno de los desencadenantes sobre efectos adversos para la salud, tales como, el agotamiento por calor y los golpes de calor (ACGIH, 1996). Las radiaciones de microondas de intensidad relativamente baja pueden ser absorbidas por el tejido neural y tienen el potencial de provocar cambios inmediatos y dramáticos en el sistema de termorregulación corporal (Adair y col., 1980).

En humanos, estudios en voluntarios han demostrado que una exposición de hasta 30 minutos, en condiciones en las que el SAR de cuerpo entero era menor de  $4\text{ W/kg}$ , causa un aumento en la temperatura interna menor de  $1^{\circ}\text{C}$  (ICNIRP, 1998).

Sin embargo, el umbral de compensación del sistema termorregulador depende de la especie. El umbral de compensación es de  $1,0\text{ W/kg}$  para ratas (Stern y col., 1979) y  $1,1\text{ W/kg}$  para los monos ardilla (Adair y col., 1980). Un estudio (Ebert y col., 2005) determinó que el sistema termorregulador de ratones puede compensar la energía absorbida y lograr una condición estable hasta  $2\text{-}5\text{ W/kg}$ .

Una temperatura por encima de  $41^{\circ}\text{C}$ - $42^{\circ}\text{C}$  Puede causar la muerte celular o degeneración (Henriques Jr, 1947).

### **1.5.2. Principales modelos experimentales “*in vitro*” utilizados para el estudio de los efectos de radiofrecuencia a nivel celular.**

Además de los efectos a nivel sistémico, o nivel tisular, es necesario comprender también los efectos que producen los campos electromagnéticos a nivel celular. Existen multitud de ensayos que emplean cultivos celulares para observar los efectos de los campos electromagnéticos sobre las diferentes rutas metabólicas o sobre la

expresión proteica en una tipología celular, estos son, los cultivos primarios o las líneas celulares.

Existen numerosos ejemplos de uso de cultivos primarios en la investigación de los efectos de las ondas electromagnéticas (Denaro y col., 2008; Pan y col., 2008; Zou y col., 2017) Los más comunes corresponden a células del sistema nervioso (Joubert y col., 2008; Jan Zhao y col., 2006; Campisi y col., 2010), aunque también se pueden encontrar algunos otros ejemplos del uso de células del sistema inmune, sangre o hueso (Golbach y col., 2015; Tice y col., 2002, Wei y col., 2008). Su evolución al ser cultivados, sigue una diferenciación similar al tejido que le dio origen, lo cual da lugar a una gran ventaja frente a otros tipos de cultivos celulares, se han probado a exponer modelos de cultivos celulares primarios tridimensionales para realizar su comparación con el sistema tradicional de crecimiento en mono capa obteniendo resultados diferentes en la distribución de la onda electromagnética (Daus y col., 2011).

En cuanto al uso de líneas celulares inmortalizadas, dentro de la investigación de los efectos de las radiaciones no ionizantes, nos encontramos múltiples ejemplos. Las líneas celulares de monocitos U937 y la línea celular de neuroblastoma SK-N-SH fueron satisfactoriamente empleadas para la determinación de los efectos de la exposición a señales GSM (Guridik y col., 2006). La línea celular de macrófagos RAW 264.7 es empleada como modelo sobre el efecto inflamatorio tras la exposición a radiaciones electromagnéticas de muy baja frecuencia (Kim y col., 2017). También en neutrófilos humanos HL-60 se han observado los efectos de radiaciones de microondas sobre la quimiotaxis y actividad fagocítica de las mismas (Koyama y col., 2015). Queda patente de este el uso de las líneas celulares como modelo experimental los estudios sobre el efecto de las radiaciones electromagnéticas debido a su fácil obtención y permanencia en el tiempo.

### **1.5.3. Comparación de los modelos experimentales “*in vivo*” e “*in vitro*”.**

En los estudios de los efectos de las radiofrecuencias, a la hora de elegir entre los modelos experimentales *in vivo* o *in vitro*, debemos atender a las características inherentes a cada modelo, teniendo en cuenta sus ventajas y sus limitaciones.

El uso de animales de laboratorio posee una mayor trayectoria en el campo de la experimentación y la validación como modelos contrastados por un mayor número de evidencias científicas. Los modelos animales representan de mejor manera como es absorbida la energía de las ondas electromagnéticas a través de diferentes tejidos y cavidades, así como, los diferentes efectos sobre los tejidos más expuestos y los situados más internamente. Cuando realizamos un modelo en cultivo celular, en cambio, la absorción es uniforme ya que las células crecen en monocapas y poseen las mismas características. Para suplir estas carencias se han desarrollado cultivos celulares tridimensionales (esféricos) que pretenden observar los efectos de las radiaciones no-ionizantes al penetrar en los tejidos. Pese a esto, los cultivos radiados solo poseían un grosor de 160 a 190  $\mu\text{m}$  (Daus y col., 2011).

Los cultivos celulares pueden ser más sensibles a las radiaciones no ionizantes ya que carecen de los sistemas de regulación *in vivo* y especialmente de los constituyentes del sistema nervioso y del sistema endocrino por lo que deberemos confirmar el modelo en cultivo respecto de los resultados en modelos *in vivo*. En los mamíferos, el hipotálamo permite amortiguar las elevaciones de temperatura producidas por las radiaciones electromagnéticas (Mason y col., 1997; Michaelson, 1982).

Por otro lado, esta mayor sensibilidad propia de los cultivos celulares nos permite observar los efectos locales de un mayor número de estímulos en comparación con los animales de experimentación. (Umarao y col., 2016).

La principal ventaja en el empleo de modelos *in vitro* es la disminución de la necesidad de realizar ensayos *in vivo*, evitándose, aunque no completamente, el sacrificio de animales de experimentación. Pese a esta ventaja, generalmente el límite de producción de cultivos celulares en un laboratorio normal es menor a 10g de células.

### **1.5.4. Las Proteínas de choque térmico (Hsp) como herramienta para el estudio de estrés celular provocado por la radiación no ionizante.**

En 1962 se observó que tras un estrés térmico o químico se inducía la síntesis de una proteína hasta el momento desconocida, la Hsp70

(Ritossa, 1962). Posteriormente, se observó que la síntesis de estas proteínas de choque térmico, no solo tenían lugar en respuesta a estímulos térmicos sino también como respuesta a la isquemia, presencia de metales pesados (Somero, 1995; resistencia a endotoxinas (Chi y col., 1996), radiaciones ultravioletas (Simon y col., 1995), tumorigénesis (Jaattela 1995), proliferación celular (Feder y col., 1992; resistencia a la apoptosis (Wyatt y col., 1996; a procesos patológicos como infecciones virales, bacterianas o parasitarias, enfermedades autoinmunes y venenos metabólicos (Welch, 1992; Simone y col., 2013).

El alto grado de conservación de estas proteínas en el genoma de los seres vivos da una pista de lo esencial de estas proteínas en el proceso celular (Kregel K., 2002), estas secuencias vitales presentan pocas mutaciones a lo largo de la evolución de las especies (Hartl, 2007).

Diversos autores empezaron a utilizar estas proteínas como biomarcadores de estrés después de la exposición a la radiación no ionizante de los tejidos o células de los mamíferos (Tipping y col., 1999; Kang y col., 1998).

Estas proteínas pueden también ser inducidas por exposición a niveles subtérmicos de radiación electromagnética, tal como se ha demostrado experimentalmente en el nematodo *Caenorhabditis elegans* (de Pomerai y col., 2000). También, El-Ezabi, M.M. describió el aumento de la proteína Hsp70 en la sangre de ratas macho tras la exposición a una frecuencia de 900 MHz (El-Ezabi, 2010).

#### 1.5.4.1. Hsp70

Las proteínas de shock térmico de 70 KDa o Hsp70 fueron descubiertas por Ritossa cuando, durante un experimento, accidentalmente aumentó la temperatura de incubación de moscas de la fruta. Ritossa encontró una elevada transcripción de una proteína desconocida. Inicialmente las proteínas fueron identificadas como proteínas inducidas por este estrés térmico y se las denominó como "Heat Shock Proteins" (Hsps) (Ritossa, 1962; 1996).

Las proteínas de la familia de las Hsp70 son expresadas ubicuamente y son codificadas por un grupo de genes altamente conservados, proteínas con una estructura similar a las Hsp70 están presentes en todos los organismos vivos. Están implicadas en el

plegamiento de proteínas y, por tanto, en su estructura, son necesarias para el correcto funcionamiento de la maquinaria celular; y ayudan a proteger a la célula del estrés térmico y de otros tipos (Tavaria y col., 1996; Morano, 2007).

Estas proteínas se encuentran normalmente formando un monómero inactivo. Cuando se produce una acumulación de proteínas incorrectamente plegadas (ya sea debido a la presencia de estrés térmico o en presencia de tóxicos como el arsénico, cadmio, mercurio, cobre, etc.) se produce el cambio conformacional que lleva a la activación de estas proteínas (Santoro, 2000).

La isoforma de la Hsp70, la Hsp72 es la principal proteína de esta familia que se expresa frente a situaciones de estrés, detectándose un mayor aumento de la proteína hasta 6h después de haber sufrido un estímulo estresante (Ogata y col., 2009). Actúa en respuesta al estrés, en procesos de control de la diferenciación celular, proliferación y tumorigénesis interactuando con la proteína p53 influyendo en su translocación (Yi y col., 2008).

En relación a el efecto de las radiaciones no ionizantes, se ha encontrado un aumento en la expresión de la proteína Hsp70 tras la exposición de células de la glándula adrenal de rata a 1.8 GHz durante 16 o 24 h (Valbonesi y col., 2014). También se encontró un incremento en la expresión de Hsp70 en el hipocampo de ratas radiadas a 2,45 GHz, en este caso el SAR era de 6 W/Kg (Yang y col., 2012). Por otro lado, A baja frecuencia existen estudios donde no encuentran variaciones en la expresión de Hsp70 en el cerebro tras una exposición crónica (Villarini y col., 2012). Estos datos nos llevan a pensar que las radiaciones no ionizantes influyen en la expresión de la Hsp70, aunque son dependientes de la frecuencia radiada.

### 1.5.4.2. Hsp90

La proteína Hsp90, al igual que la proteína Hsp70, pertenece al grupo de las proteínas de choque térmico, con un peso molecular de 90 KDa, y es una de las proteínas más abundantes en organismos celulares y especies animales, llegando a constituir entre el 1-2% de las proteínas citosólicas celulares (Powers y col., 2007).

Cada una de las isoformas de la proteína Hsp90 posee diferentes roles en el desarrollo y la diferenciación de las células. Aunque la mayoría de las funciones de Hsp90 pueden ser desarrolladas tanto por



la Hsp90 $\alpha$  (inducible) como por la Hsp90 $\beta$  (constitutiva), algunas funciones se relacionan mayoritariamente con una isoforma. La sobreexpresión de Hsp90 $\alpha$  se ha relacionado con el desarrollo de tumores, la regulación del ciclo celular y con la estimulación de factores de crecimiento vía tirosinkinasa. Por otro lado, Hsp90 $\beta$  ha sido implicada en la adaptación celular a largo plazo (Sreedhar y col., 2004).

Independientemente de la isoforma, las proteínas Hsp90 se expresan mayoritariamente en el citoplasma, expresándose también en menor proporción en el núcleo celular. En condiciones de estrés térmico la expresión en el núcleo aumenta ligeramente (Van Bergen en Henegouven y col., 1987).

Aunque aún no se conoce en profundidad la función de Hsp90, la principal función documentada es la de chaperona molecular, la Hsp90 estabiliza las proteínas citosólicas en condiciones normales, ayudan al plegamiento de proteínas desnaturalizadas bajo situaciones de estrés, impidiendo así su agregación e impide cambios genéticos que afectarían negativamente al funcionamiento de la célula (Sangster y col., 2008). También se ha estudiado su participación en determinadas enfermedades, tales como enfermedades autoinmunes, neurodegenerativas y el desarrollo del cáncer en donde se están realizando ensayos terapéuticos con fármacos inhibidores de Hsp90 (Taylor y col., 2007; Rodina y col., 2007; Pearl y col., 2008; Powers, 2007; Waza y col., 2006).

La función de la proteína Hsp90 en el sistema nervioso central (SNC) no es conocida, a pesar de esto, sus elevados niveles en las neuronas en condiciones fisiológicas hacen suponer que desenvuelven un importante papel en el desarrollo del sistema nervioso y en el mantenimiento de la correcta homeostasis celular (Gass y col., 1994; Takaya y col., 2003).

La expresión de HSP90 $\alpha$  y  $\beta$  varía según el estado del desarrollo. También se ha investigado la función de HSP90 $\alpha$  en la regulación del receptor esteroideo, debido a la gran importancia en que posee este en la regulación de múltiples procesos fisiológicos (Grand y col., 2007; Loones y col., 2000; Furray y col., 2006). Su ubicación se encuentra mayormente en el citoplasma neuronal, encontrándose en menor medida en los procesos neuronales (dendritas) y en el núcleo celular, pero nunca en zonas de sinapsis (Gass y col., 1994; D'Souza y col., 1998). Nuestro equipo de investigación encontró que tras una

exposición a una frecuencia de 2450 MHz el nivel de la proteína HSP90 $\alpha/\beta$  aumentaba en distintas zonas del cerebro (Jorge Mora y col., 2010).

Aparecen grandes niveles de Hsp90 en diversas áreas encefálicas: neocórtex, sistema límbico (hipocampo, complejo amigdalario, corteza piriforme entorrinal, angular y olfatoria), tálamo e hipotálamo, estriado, cerebelo y núcleos del troncoencéfalo; lo que deja constancia de la importancia de Hsp90 en el metabolismo del SNC (Gass y col., 1994; D'Souza y col., 1998).

Bajo condiciones de hipertermia, se ha encontrado un aumento importante en los niveles de expresión de Hsp90 en el SNC en estudios en animales (Ramaglia y col., 2004a; 2004b). En células gliales se ha reportado un aumento en los niveles de expresión de Hsp90 tras un estímulo citotóxico, lo que demuestra la existencia de una respuesta frente al daño neuronal que implica a Hsp90 y cuyo mecanismo no es todavía conocido (Jeon y col., 2004).

Parece existir un efecto de precondicionamiento de las Hsp a nivel neuronal. La aplicación de un preestímulo térmico en cultivos neuronales protege en menor medida a la célula de efectos apoptóticos y previene del daño celular de agentes tóxicos (Mailhos y col., 1993).

Nuestro equipo de investigación ha detectado modificaciones en los niveles de expresión de la proteína Hsp90 en la glándula tiroides, así como cambios en la morfología y distribución celular de la proteína Hsp90 sin alterarse la actividad preapoptótica (Misa-Agustino y col., 2015; 2012). Sin embargo, no encontraron este aumento de la expresión de Hsp90 ni en cerebro de rata radiado a 1.8 GHz ni en células de la aorta de porcina radiadas a baja frecuencia (Watilliaux y col., 2010; Bernardini y col., 2007). Otros autores indican una disminución de la expresión de la Hsp90 cuando se radió a 1.95 MHz una línea de células epidérmicas (Caraglia y col., 2005). Estos estudios parecen mostrar que la expresión Hsp90 se ve fuertemente influida por la frecuencia radiada.

#### **1.5.5. Producción de estrés oxidativo por la exposición a radiaciones no ionizantes.**

En la célula, la generación accidental de estrés oxidativo, esta mediado por una serie de especies altamente oxidante conocidas por especies reactivas del oxígeno (ROS). Estas se forman de manera natural como subproducto del metabolismo normal del oxígeno y tienen



un importante papel en la señalización celular. Cuando los niveles de estas especies aumentan de forma incontrolada, son capaces de peroxidar en los lípidos de membrana, oxidar las proteínas, inactivar centros activos y romper moléculas de ADN, dando lugar en última instancia a la muerte celular, tanto por necrosis como por apoptosis (Buttke y col., 1994).

Las especies reactivas del nitrógeno son una familia de moléculas antimicrobianas derivadas del óxido nítrico (NO). Actúan en conjunto con las especies reactivas del oxígeno en el daño celular, provocando estrés nitrosativo (mediado por especies reactivas de nitrógeno).

#### 1.5.5.1. Producción de óxido nítrico

El óxido nítrico (óxido de nitrógeno o monóxido de nitrógeno. IUPAC), es un compuesto químico cuya fórmula molecular es NO. En condiciones esta molécula se encuentra en forma de gas incoloro. El óxido nítrico es un radical libre, es decir, la unión de la molécula posee un electrón desapareado, esta característica puede provocar efectos negativos en los seres vivos.

Las dos fuentes de NO en las células son la endógena y la exógena. La síntesis endógena del NO se lleva a cabo mediante la actuación de las enzimas óxido nítrico sintasa (NOS), que oxida el grupo guanidina del aminoácido L-arginina que resulta en la formación de NO y L-citrulina. Este proceso requiere la oxidación de NADPH y la reducción del oxígeno molecular. En mamíferos, existen 3 isoformas de la enzima NOS:

A) nNOS. La variante neuronal de la NOS (nNOS) produce NO en el SNC como en el periférico. La nNOS se puede asociar a la membrana plasmática desempeñando un papel de comunicación.

B) eNOS. La variante endotelial de la NOS (eNOS o NOS3) produce NO en los vasos sanguíneos y está involucrada con la regulación de la función vascular. Es de expresión constitutiva dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y genera una liberación de NO basal. Se puede asociar con la membrana celular y con la membrana del aparato de Golgi.

C) iNOS. La variante inducible de la NOS (iNOS) ha sido descrita como insensible a calcio, probablemente debido a su estrecha relación con la calmodulina (CAM)

Los genes de respuesta celular frente a estímulos de estrés IRF-1 y de NF- $\kappa$ B actúan como promotores de la iNOS, lo que apoya la idea de que la inflamación produce una estimulación de la transcripción de iNOS. Tras un evento inflamatorio, la iNOS es producida en grandes cantidades, como por ejemplo tras la actuación de citocinas proinflamatorias (por ejemplo, interleucina-1, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interferón gamma) (Green y col., 1994).

La inducción de la expresión de la iNOS tiene lugar por lo general en un ambiente oxidativo, por lo que la NO puede reaccionar con moléculas reactivas de nitrógeno/superóxido que conduce a la formación de peroxinitrito y a la toxicidad estas características definen el papel de la iNOS en la inmunidad de los mamíferos, lo que revela su importancia en la función oxidativa de los macrófagos actuando como antimicrobiano y antitumoral (Mungrue y col., 2002).

Las fuentes exógenas de NO actúan de forma suplementaria cuando el cuerpo no es capaz de generar el suficiente NO como para desarrollar las funciones biológicas normales. Se ha investigado sobre formas alternativas de suministrar NO, como dispositivos de liberación de NO, así como también, mejoras en los donantes actuales de NO. (Hou y col., 1999). También algunos compuestos exógenos pueden generar NO endógeno. Ejemplos destacados son S-nitrosotioles, ciertos nitratos orgánicos, complejos de metales nitrosilados, complejos de dinitrosil-hierro (DNIC) e incluso aniones de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) en condiciones hipóxicas (Van Faassen y col., 2009; Van Faassen y col., 2007).

El NO es un importante regulador y mediador de numerosos procesos en los sistemas nervioso, inmune y cardiovascular. Estos incluyen la relajación del músculo liso vascular, lo que resulta en una vasodilatación arterial y el aumento del flujo sanguíneo. El NO producido por la nNOS también actúa como neurotransmisor y se ha asociado con la actividad neuronal y diversas funciones, como el aprendizaje. El NO también media parcialmente en la citotoxicidad de los macrófagos contra los microbios y las células tumorales. En este caso, el óxido nítrico sintasa es la NOS inducible. Bajo condiciones de sepsis los macrófagos causan exceso de producción de NO, lo que produce vasodilatación y la hipotensión en la sepsis. Además de mediar

en las funciones normales, el NO está implicado en estados fisiopatológicos tan diversos como la hipertensión, los accidentes cerebrovasculares y las enfermedades neurodegenerativas (Davies y col., 1997).

En algunos casos, es necesaria la existencia de bajos niveles de producción de óxido nítrico para proteger los órganos, como el hígado, del daño isquémico. En este, la producción la elevada de óxido nítrico se asocia con la enfermedad del hígado graso no alcohólico y es esencial para el metabolismo de los lípidos hepáticos bajo inanición (Gu y col., 2014).

Algunos estudios ponen de manifiesto el efecto de las radiaciones electromagnéticas sobre la síntesis de óxido nítrico en la célula. Se ha visto que una radio-frecuencia de 27.12 MHz pulsada estimula la producción de óxido nítrico a través del aumento de la concentración de Ca<sup>+</sup> intracelular (Pilla, 2012). A 2,1 GHz la exposición causó un incremento en los niveles de NO en el corazón de ratas de laboratorio (Olgar y col., 2015) en la línea celular de macrófagos RAW 264.7, la exposición a radiación de baja frecuencia, promueve la aparición de NO y de ROS (Kim y col., 2017).

#### **1.5.6. Estudios relacionados con la apoptosis.**

La apoptosis es un mecanismo de “suicidio” celular que se produce en las células de los mamíferos durante el desarrollo normal y también como una respuesta a situaciones de lesión o enfermedad.

La apoptosis puede seguir dos vías diferentes, la vía intrínseca (intracelular) y la vía extrínseca (extracelular).

La vía extrínseca inicia la apoptosis, mediante la interacción con los receptores transmembrana conocidos como receptores de muerte, su activación da lugar a la muerte de la célula, en esta categoría encontramos:

A) Receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR). La unión del TNF a estos receptores transmembrana da lugar a la unión con la proteína TRADD (TNFR-Adopter protein vía Death Domain) formando un complejo que interacciona con las moléculas de señalización y activa la expresión de genes de respuesta celular frente a estímulos de estrés NFkB y JNK/AP-1 Los

modelos TNF- $\alpha$ /TNFR1 son los más característicos de esta vía (González y col., 2014a).

B) Receptores Fas. Son receptores transmembrana, activan las caspasas iniciadoras (procaspasa-8 y 10). La activación de estas pro-caspasas, marca el inicio de la apoptosis. Las caspasas efectoras, (caspasas-3, 6 y 7) activan las vías de degradación celulares. Las endonucleasas y proteasas son activadas degradando el material nuclear, las proteínas y el citoesqueleto. Estos tipos de receptores poseen una gran importancia en modelos de apoptosis, como pueden ser el suicidio de células T maduras, la eliminación de células cancerosas mediante células T citotóxicas y natural killer, con el fin de limitar las respuestas inmunes (Jordan, 2013).

La vía intrínseca de la apoptosis se desencadena cuando los mecanismos de la célula no son capaces de subsanar el daño interno ya sea esté en el ADN, por aumento en la concentración de calcio, por estrés celular o debido a la generación de especies ROS en la mitocondria (Lozano y col., 2014; Gonzalez y col., 2010).

El daño en el ADN activa la expresión del gen supresor de tumores p53, este a continuación activa la expresión de los genes pro-apoptóticos sintetizando las proteínas de la familia Bcl2 Bax y Bak. Los miembros de la familia Bcl-2 regulan el proceso de apoptosis mediante el control de la liberación del citocromo C en la mitocondria.

La acumulación de la ceramida puede provocar cambios iónicos en la mitocondria lo que produce un descenso del potencial transmembrana y forma un poro transitorio en la membrana mitocondrial, conduciendo a la apoptosis. Los valores de ceramida pueden ser aumentados tanto por factores externos (radiación UV, agentes oxidantes), como a través de receptores de membrana (FasR y TNFR) o directamente por glucocorticoides (Jordan, 2013). En algunas investigaciones se observó que la radiación ionizante causa apoptosis en algunas células, mediada por la activación de la esfingomielinasa de la membrana y, en última instancia, la generación de ceramida (Haimovitz-Friedman y col., 1994). La ceramida tiene también un papel especial en la muerte celular mediada por autofagia. La ceramida regula positivamente los genes de autofagia BNIP3 y Beclin-1, por otro lado, la inhibición de la síntesis

de ceramida atenúa la autofagia producida por Tamoxifen en células humanas de cáncer de mama (Hannun, 1997).

Se cree que la exposición a campos de radiofrecuencias y microondas pueden producir daño suficiente como para iniciar las rutas de apoptosis (Aitken y col., 2005; Diem y col., 2005; Tice y col., 2002). Esto produciría por tanto una activación de las Caspasas (Tian-Yong Zhaoa y col., 2005) y por tanto la activación de la ruta de la apoptosis. Una gran parte de los estudios de apoptosis producida por la telefonía se han realizado sobre cultivos celulares, en los que se han descrito aumento de la apoptosis inducida por RF del estándar de los teléfonos móviles en células de la glía (Dasdag y col., 2009) epidermis (Caraglia y col., 2005) o endotelio (Oral y col., 2006). Por el contrario, estudios *in vivo* de la caspasa- 3 en testículo sugieren que la exposición a radiofrecuencias no aumenta la apoptosis (Falzone y col., 2010).

#### 1.5.6.1. Caspasa-3

La caspasa-3 es una proteína miembro de las cistein-proteasas (Alnemri y col., 1996). La activación secuencial de las caspasas juega un rol esencial en la fase de la apoptosis. Esta codificada por el gen CASP3 que está presente en numerosos mamíferos, pájaros, lagartos, lisanfibios y teleósteos.

En la célula, la caspasa-3 se activa tanto en la vía extrínseca (Dominio de muerte) como en la intrínseca (mitocondriales) (Salvesen, 2002; Ghavami y col., 2009). Las pro-caspasa-3 prácticamente no tiene actividad hasta que es estimulada por una caspasa iniciadora después de que activado la vía de señalización apoptótica. (Walters y col., 2009). La activación extrínseca desencadena la cascada característica de la vía apoptótica de las caspasas, en la que la caspasa-3 desempeña un papel dominante. (Perry y col., 1997).

La exposición de células neuronales a radiación no ionizante, provoca un aumento de la enzima caspasa-3 a frecuencias de 1800 MHz, 2.856 GHz y 2. (Xing y col., 2016; Zuo y col., 2014; López-Furelos y col., 2016).

#### 1.5.6.2. TNF- $\alpha$

El factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , abreviatura del inglés tumor necrosis factor) es una proteína del grupo de las citoquinas, es liberado por varias células del sistema inmune. El TNF- $\alpha$  es un

poderoso agente proinflamatorio que se libera después de un trauma, infección, inflamación, apoptosis y en el daño tisular y reabsorción ósea asociada a la artritis reumatoide, así como en otras patologías (González y col., 2014a). Los macrófagos son los principales productores de TNF- $\alpha$  y, curiosamente, también son altamente sensibles a este agente inflamatorio de forma inmediata.

La secreción del TNF- $\alpha$  activa el endotelio vascular de forma local, aumenta la liberación de NO y la vasodilatación y aumenta la permeabilidad vascular, lo que provoca el reclutamiento de las células inflamatorias, inmunoglobulinas, dando como resultado la activación de los linfocitos T y B. También promueve la agregación plaquetaria, seguramente la necrosis tumoral tenga lugar debido a la obstrucción vascular.

Estimula la fagocitosis de los macrófagos y la producción de oxidantes de IL-1 y la prostaglandina E2 lipídica inflamatoria (PGE2). Los macrófagos pueden ser activados mediante la producción de TNF- $\alpha$  lo que da lugar a la migración a sitios de inflamación, donde se encuentran con patógenos que lisan. Esto se logra mediante la producción de ROS y mediante la inducción de la iNOS que produce NO.

Se ha estudiado una posible relación de la expresión del TNF con la exposición a ondas electromagnéticas, debido a la importancia de este en los procesos de inflamación de los organismos. Se ha encontrado que determinadas frecuencias electromagnéticas pueden promover o atenuar la expresión de TNF tanto en macrófagos (Sinotova y col., 2004), en la microglía cerebral (Yang y col., 2016; Lu y col., 2014) mientras que en otros casos a diferentes frecuencias y tejidos no se encontraron diferencias significativas (Tuschl y col., 2006; Saygin y col., 2011).

### 1.5.6.3. Interacción de la Hsp70 con las vías apoptóticas.

El incremento en la expresión de la Hsp70 interviene en la apoptosis mediada por estrés e inhibe el procesamiento de las procaspasas 3 y 9 (Mosser y col., 1997). La sobre expresión también actúa previniendo la pérdida de la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa e impide la liberación del citocromo C al citosol (Creagh y col., 2000).

Actúa en la vía extrínseca de la apoptosis inhibiendo proteínas que intervienen en la cascada de que activan los receptores de apoptosis presentes en la membrana celular. (Tournier y col., 2000)

En la vía intrínseca de la apoptosis, la proteína Hsp70 inhibe la proteína Bax que permite la liberación de los elementos necesarios para llevar a cabo la apoptosis (Gotoh y col., 2004).

En células embrionarias queda de manifiesto la importancia de esta proteína ya se ha encontrado que los niveles de expresión de Hsp 70 están correlacionados con la apoptosis, existiendo una mayor producción de apoptosis a unos menores niveles de Hsp70 (de la Rosa y col., 1998), esta mayor supervivencia se pueda atribuir a la capacidad de la Hsp70 de suplir daños provocados por estrés térmico o daños en el ADN o que desencadenan procesos que la cascada que desencadena la apoptosis (Beere, 2004).

La acción de los CEM provoca un aumento de los niveles de la Hsp70 modificando la actividad de la caspasa-3 (Calabrò y col., 2012; Akan Z. y col., 2010) y de otras proteínas fundamentales para la vía intrínseca de la apoptosis como p53, bcl2 (Lee H.J. y col., 2012).

### **1.5.7. Efectos biológicos por la interacción de una Radiofrecuencia.**

Los tejidos más susceptibles a las radiaciones son los que tienen un mayor porcentaje de agua en ellos (sistema nervioso central, globo ocular), lo cual se manifiesta frecuentemente como cefaleas, insomnio, y otras alteraciones bajo el efecto de exposición a este tipo de radiaciones. En órganos con poca o nula circulación sanguínea (globo ocular) el daño puede ser mayor puesto que la pérdida de calor es más lenta.

#### **1.5.7.1. Efectos en el tejido nervioso**

Los efectos biológicos de las radiaciones no ionizantes en la cabeza y en los tejidos del sistema nervioso han sido ampliamente investigados, sobre el hecho de que se trata del área del cuerpo humano que más absorbe la energía por el uso de los teléfonos móviles.

Se ha demostrado que las radiaciones electromagnéticas afectan diversos canales iónicos de las membranas celulares (Repacholi, 1998), aumentan el paso de calcio a través de las membranas celulares (Dutta y col., 1984), proceso en el cual parecen estar involucrados los radicales



libres (Phelan y col., 1992). Se produce así un aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica. Este aumento se produce de forma considerable bajo la acción de radiación electromagnética en los rangos de 2,45 GHz (Neubauer y col., 1990) y 915 MHz (Salford y col., 1994), permitiendo el paso de sustancias tóxicas que normalmente no pueden atravesar esta barrera,

Dado que la liberación de neurotransmisores está influida por los niveles de calcio, parece lógico que la secreción de neurotransmisores también se vea influida por la exposición a RFs. A niveles de intensidad bajos, Lai y col., 1987; 1989; 1989; 1990; 1991; 1994) informaron que las ratas expuestas durante 20 minutos a 2,45 GHz presentaban un aumento de la recaptación de colina y una reducción en la concentración de receptores de acetilcolina, mientras que en exposiciones de 45 minutos tenía el efecto contrario.

Entre los efectos que se encontraron tras la exposición a radiaciones no ionizantes tanto en cerebro (Mausset Bonnefont y col., 2004; López Martín y col., 2006; 2009; Jorge Mora y col., 2010) como en cerebelo (Rağbetli y col., 2010; Albert y col., 1988) y se considera que tiene una alta probabilidad de aumentar el estrés celular llegando incluso a activar la autofagia en algunas regiones del cerebro (Kim y col., 2018). Las alteraciones en el sistema nervioso se pueden observar incluso después de una única exposición (Kesari y col., 2011; Dasdag y col., 2009; Calabrò y col.; 2012; López-Furelos y col., 2016).

### 1.5.7.2. Efectos en el Sistema reproductor.

La interacción de fuentes electromagnéticas en las células germinales y en la fertilidad masculina ha sido un tema de gran interés en los últimos años, como se refleja en el número de estudios que examinan los efectos de la radiofrecuencia en los tejidos genitales, debido a la proximidad de la emisión de radiofrecuencia fuente a cuando se lleva un teléfono celular en un bolsillo cerca de los testículos. Los hallazgos que han sido reportados demuestran la disminución de la espermatogénesis y de las células de Leydig y un aumento del estrés oxidativo y la apoptosis en el tejido testicular después de la exposición repetida con las frecuencias de radio de 2,45 o 0,9 GHz (Saygin. y col., 2011; Mailankot y col., 2009) en ratas de 28 días de edad. También, se ha descrito que la exposición a una radiación de 900 MHz tiene efectos nocivos aumentando el riesgo de cáncer (Sepehrimanesh y col., 2017).



Çetkin M. y col., Afirman que “los campos electromagnéticos creados por teléfonos móviles causan cambios morfológicos e histológicos en el tejido del epitelio germinal que afecta negativamente” (Çetkin y col., 2017). Otros autores, sin embargo, no encontraron indicios morfológicos o bioquímicos de un aumento de la apoptosis en las células sexuales masculinas (Lee, y col., 2010) o de estados pre-apoptóticos con mayor actividad de las caspasas (Falzone y col., 2010; Dasdag y col., 2007) después de la exposición de los animales a radiofrecuencias. Se ha reportado que en mujeres expuestas a CEM aumenta casi el doble la probabilidad de sufrir un aborto espontáneo (Jutilainen J. y col., 1993). Sin embargo, otros autores no coinciden con estos resultados (Belanguer y col., 1998).

#### 1.5.7.3. Efectos en el Sistema inmune.

Es lógico pensar que, si hay alguna clase de peligro en el cuerpo humano, el sistema inmunitario se activará para proporcionar una defensa al mismo. La exposición a radiaciones no ionizantes promueve la activación del sistema inmune (Lushnikov y col., 2001), además, puede provocar también daños en el mismo del mismo modo que en otros tejidos (Aydin y col., 2011; Quaglini y col., 2000)

Entre varios trabajos podemos destacar los del grupo de investigación de Scarfi M.R. en linfocitos humanos donde se observó una respuesta adaptativa de los linfocitos y aumento de la enzima caspasa-3 cuando fueron radiados a 900 MHz (Scarfi y col., 2006; Palumbo y col., 2008; Sannino y col., 2011). Tice (Tice y col., 2002) documentó que tras radiar células sanguíneas observaron daño en el ADN de los linfocitos y presencia de micronúcleos que se traducen en lesión en los cromosomas. Sykes y col., observaron que la radiación de radiofrecuencia daña la reparación del ADN. (Sykes y col., 2001). En el 2006 el equipo del Dr. Szmigielski en Polonia demostró un aumento significativo de respuesta a los mitógenos y una alta actividad inmunogénica de los monocitos, por lo que se deduce que las células del sistema inmunológico pueden ser dañadas y las defensas de los individuos alteradas (Stankiewicz y col., 2006). También afectan a los macrófagos alterando su metabolismo interno así su respuesta frente a agentes patógenos (Novoselova y col., 2017; Akan y col., 2010). Sin embargo, todavía hay carencia de estudios concernientes a los efectos

de las radiaciones no ionizantes sobre las células y reacciones inmunocompetentes.

#### 1.5.7.4. Efectos en el Sistema muscular.

Sastre demostró que la exposición a una frecuencia de 60 Hz causa una disminución en la variabilidad de la frecuencia cardíaca en la especie humana (Sastre y col., 1998). Se ha asociado una disminución de la variabilidad en la frecuencia cardíaca y un mayor riesgo para la ocurrencia de alteraciones cardiovasculares (Tsuji y col., 1996).

Aunque, la exposición a las radiofrecuencias afecta al desarrollo del tejido muscular y puede alterar el metabolismo de las células musculares (Erkut y col., 2016; Vukova y col., 2005; Radicheva (2002), la ausencia de apoptosis en el tejido (Martin y col., 2003), hace pensar que este tejido es o bien poco susceptible a las radiaciones no ionizantes o bien no se observa un impacto negativo debido a su exposición (Wei y col., 2016).

#### 1.5.7.5. Efectos en el Tejido adiposo.

Según se cree, los depósitos de grasa actúan absorbiendo el calor y concentrándolo, lo cual favorece la aparición de alteraciones cuando son sometidos a radiaciones no ionizantes con efectos térmicos. No es extraño pensar que en el caso de las radiaciones no ionizantes atérmicas y no térmicas, el efecto biológico pueda verse aumentado y sea diferente en una persona obesa o en una persona cuyo índice de masa corporal sea el correcto.

Además de proporcionar un efecto amplificador, el tejido adiposo también es susceptible al efecto de las radiaciones no ionizantes, pueden encontrarse efectos tales como lisis celular (Trelles y col., 2009) o cuadros inflamatorios (de Felipe y col., 2007).

### **1.5.8. Efectos biológicos por la interacción multi-frecuencia.**

Comúnmente, los estudios científicos sobre las radiaciones no ionizantes se basan en los efectos que produce una onda sinusoidal de radiofrecuencia pura. En un escenario real habría la confluencia de múltiples ondas que se emitirían de forma simultánea. En los últimos años, se han realizado escasos estudios experimentales con animales con radiaciones múltiples, los realizados con radiofrecuencias utilizadas en Asia, por Hae-June Lee que utiliza una mezcla de

radiaciones CDMA (acceso múltiple por división de código, 849 MHz) y WCDMA (Acceso múltiple por división de código de banda ancha, 1,95 GHz). Hasta la fecha en los estudios desarrollados con este sistema (Hae-June Lee y col., 2010; 2011; 2012) no encontró ninguna incidencia para la salud. También del mismo grupo Jin Y.B. experimentó con estas mismas frecuencias encontrando ausencia de efectos producidos por su exposición (Jin y col., 2011; 2012; 2013), al igual que Kang K.A. en 2014 (Kang y col., 2014). Estos estudios parecen contrastar con Mailankot M. que señala que a unas frecuencias combinadas de 0,9+1.8 GHz la movilidad espermática y la espermatogénesis disminuyen (Mailankot y col., 2009). Los escasos estudios epidemiológicos conocidos de exposición a multifrecuencia en adultos, niños y adolescentes en Alemania describen efectos en la salud de los grupos estudiados (Silke Thomas y col., 2008; 2009). y la obtención de la dosimetría de varias señales se calcularon apartir de un sumatorio de los rangos de las distintas frecuencia.

Recientemente se han realizado estudios en neonatos de rata en los que se llegaron a combinar 8 radiofrecuencias diferentes entre el rango de 800MHz a 5.2 GHz, no encontrando efectos adversos sobre el desarrollo de los fetos (Shirai y col., 2017).

Los efectos biológicos y mecanismos que actúan tras la exposición a la combinación de varias radiofrecuencias (900 + 2450 MHz) constituyen la investigación experimental de esta tesis doctoral (López-Furelos Y col., 2012; 2016; 2018).

## II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

### 2.1. JUSTIFICACIÓN.

Los campos electromagnéticos (CEM) están en nuestra vida diaria formando parte de un estilo de vida en el que la tecnología constituye una herramienta indispensable. La presencia de varios tipos de antenas en áreas urbanas y/o rurales constituye un escenario real en el que una gran parte de la población está expuesta a la interacción continuada de múltiples radiofrecuencias (RF). A pesar de esto, en estos últimos años es hay muy escasa investigación centrada en el estudio de los efectos biológicos en los seres vivos causados por la acción de señales simultáneas de RF. Así, los límites legales de dosimetría asociada con la exposición de señales múltiples (REAL DECRETO 1066/2001 no están basados en estudios experimentales biológicos (modelos animales). Se puede decir por tanto que, debido a la falta de evidencias experimentales en la que se basa la normativa, hay una ausencia de certeza en la efectividad de los límites de la exposición de varias RF en humanos.

Hay numerosos estudios que describen la respuesta tisular o celular provocada por la acción de una única fuente de radiación no ionizante, sin embargo, no existen evidencias que demuestren que la respuesta biológica a múltiples frecuencias sea distinta a la de una única señal. Tampoco hay hipótesis o datos que expliquen los posibles mecanismos de acción de varias señales de radiación al interactuar con el tejido vivo, si se suman, se potencian o incluso se anulan las señales de radiación. El escaso conocimiento de efectos de la interacción de múltiples RF en humanos hace necesaria la búsqueda de evidencias científicas obtenidas a través de ensayos en laboratorio, empleando modelos experimentales *in vivo* o *in vitro* previamente expuestos a radiación combinada.

Los datos experimentales obtenidos de la radiación combinada de animales pequeños y/o células sensibles pueden permitir hacer a

posteriori un balance postmortem de biomarcadores tisulares de citotoxicidad y programar estudios futuros que determinen si hay riesgos en la salud humana.

En esta tesis doctoral se ha realizado un estudio experimental de laboratorio con animales y/o una línea celular de macrófagos expuestos a la radiación de una o dos señales combinadas de radiofrecuencia de 900 y 2450 MHz, utilizada en inalámbricos, wifi o Bluetooth, empleando niveles de SAR subtérmico. Para ello se analizaron de forma independiente, en un modelo experimental de rata macho las modificaciones tisulares y nucleares de apoptosis, así como los niveles de estrés celular mediante las proteínas Hsp90 y Hsp70.

Igualmente se analizaron las funciones citoprotectora, citotóxica, antiinflamatoria o fagocítica, en la línea celular de macrófagos RAW 264.7 expuesta con una o dos RF. La exposición aguda o continuada se llevó a cabo en ambos modelos en un sistema experimental conectado a una cámara comercial de ensayos electromagnéticos GTEM.

## **2.2. OBJETIVOS**

**I.** Desarrollar dos modelos experimentales *in vivo* (rata macho Sprague-Dawley) e *in vitro* (línea celular de macrófagos RAW 264.7) para uso en sistema de radiación previa combinación de frecuencias en una cámara de radiación GTEM, y llevar a cabo la adaptación del equipo a los requerimientos de los modelos.

**II.** Estudiar y comparar el efecto producido por la exposición del modelo *in vivo* (rata macho Sprague-Dawley) o del modelo *in vitro* (línea celular RAW 264.7) con una combinación de frecuencias (900 + 2450 MHz) con respecto a exposición a una sola frecuencia (900 ó 2450 MHz).

**III.** Obtención de valores de SAR subtérmicos en el cuerpo y en los órganos del modelo de rata y en la línea celular de macrófagos donde se llevaron a cabo los estudios biológicos tanto para radiación de una o varias RF.

**IV.** Investigar si existen indicios de estrés en el modelo animal durante la radiación midiendo las temperaturas rectales antes y después de la exposición a una o dos radiofrecuencias.

**V.** Analizar morfológicamente ocho tejidos de rata (cerebro, cerebelo, hipófisis, grasa músculo, lengua, timo y testículo) para

evaluar los posibles signos de citotoxicidad, lesión o apoptosis después de la exposición a una o dos RFs.

**VI.** Determinar la variabilidad de la respuesta, post-radiación de multifrecuencias, determinando la concentración de las proteínas de estrés térmico Hsp90 y Hsp70 en cerebro y cerebelo de rata, como expresión de la acción citoprotectora de las chaperonas.

**VII.** Explorar si existe la activación de la vía de la apoptosis mediante la determinación de la concentración la proteína pre-apoptótica caspasa-3 en el cerebro y cerebelo, como expresión de daño celular por exposición a una o varias radiofrecuencias.

**VIII.** Analizar la viabilidad y crecimiento celular de la línea celular RAW 264.7 después de un período de 4, 24, 48 ó 72 h de exposición continuada de una o dos radiofrecuencias combinadas, en la cámara GTEM.

**IX.** Evaluar la respuesta citotóxica de los macrófagos al estrés oxidativo causado por la radiación, mediante la cuantificación de la producción del óxido nítrico.

**X.** Explorar la función citoprotectora e inflamatoria de la línea celular de macrófagos RAW 264.7, analizando los niveles de la proteína de estrés térmico Hsp70 y la proteína TNF- $\alpha$  en la radiación única o combinada.

**XI.** Evaluar la actividad fagocítica de los macrófagos de la línea celular RAW 264.7 después de someter las células a las distintas situaciones de exposición con dos radiofrecuencias diferentes o con ambas combinadas.



### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**

Para la realización de la experimentación de esta tesis se emplearon un total de 86 ratas macho Sprague-Dawley. Fueron seleccionadas las ratas que poseían un peso en torno a 200 g, a fin de que estuviesen lo más cercanamente aproximadas al fantoma numérico de rata macho de 198.3 g. Los animales se mantuvieron a  $22\pm^{\circ}\text{C}$  y con ciclos de 12:12 h de luz/oscuridad.

Todos los experimentos se realizaron siguiendo las directrices de las regulaciones europeas de protección de los animales (Directiva 86/609), la directiva española vigente RD1201/2005, la declaración de Helsinki y la guía para el cuidado y el uso de los animales de laboratorio, como adopto y promulgo el US National Institutes of Health (NIH Publicación No. 85-23, revisado 1996). Todos los protocolos experimentales se aprobaron por el Comité de Bioética sobre el Uso y Cuidado de los Animales de Santiago de Compostela bajo el código de proyecto 15005AE/11/FUN.01/BIOL.AN.08/ELM2 y mantenidos en el CENTRO 15005AE.

Se usó la cantidad mínima necesaria de animales de laboratorio necesarios para mantener unos datos fiables en los resultados, dichos animales fueron manipulados con el mayor cuidado posible para no generar un sufrimiento innecesario.

Además de los animales de laboratorio, para la realización de la experimentación de esta tesis se emplearon 36 cultivos independientes de la línea celular RAW 264.7. La línea celular de macrófagos RAW 264.7, que fue adquirida de la American Type Culture Collection (ATCC; cat. N TIB-71) es una línea celular generada inicialmente a partir de un tumor inducido por el virus de la leucemia murina en ratones BALB/c. carece de inmunoglobulinas de superficie y posee actividad fagocítica.



### 3.1. DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA EXPERIMENTAL DE RADIACIÓN.

El sistema posee dos generadores de señales vectoriales, GSV Freq. # 1 y GSV Freq. # 2, cada uno puede generar una señal sinusoidal pura de 900 y 2450 MHz respectivamente. La salida de ambos generadores está conectada a un divisor de señal usado, en sentido estricto, como un mezclador de señal (ME), y la señal pasa entonces a través de un amplificador (AMP). Una vez amplificada, la señal se introduce en el acoplador direccional (AD) y luego se envía directamente a la cámara de radiación GTEM, donde la rata (fig. 2, R) está inmovilizada en un soporte de metacrilato y donde se sitúan los frascos de cultivo (fig. 4,

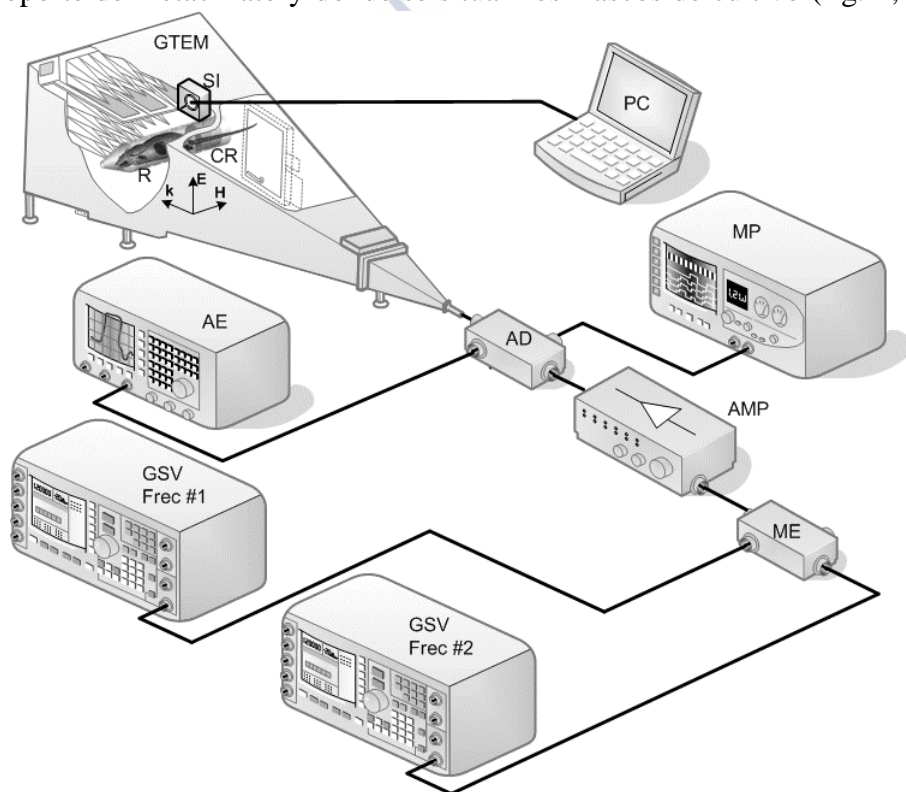


Figura 2. En la figura aparece la representación gráfica del sistema de radiación multifrecuencias para la radiación in vivo de animales pequeños (López-Furelos y col. 2012).

B), en el campo de la máxima uniformidad. El AD hace posible medir los valores de potencia incidentes,  $P_{IN}$ , utilizando el medidor de potencia (MP), y así determinar la potencia de entrada deseada para el sistema. El valor de la potencia reflejada,  $P_{REF}$ , también se puede monitorizar y se obtuvo del analizador de espectro (AE).

El uso del AE hace posible observar el tipo de onda presentes en la cámara para determinar la pureza espectral de la onda sinusoidal utilizada en el experimento. La onda de RF impacta R en la dirección  $k$ , con los vectores  $E$  y  $H$  posicionados perpendicular paralelamente al eje principal de R, respectivamente.

Una sonda isotrópica (SI) se utiliza para medir el campo y determinar el valor de pico. Esta medición se lleva a cabo antes de colocar la rata en la cámara, utilizando los valores de entrada de señal deseada. De esta manera, es posible definir el comportamiento de la cámara en la zona de medición. Este valor se utiliza posteriormente para crear una simulación más objetiva de la cámara GTEM utilizando tres frentes de onda plana que reproducen los datos obtenidos con la sonda.



Figura 3. Disposición de la rata en la cavidad GTEM

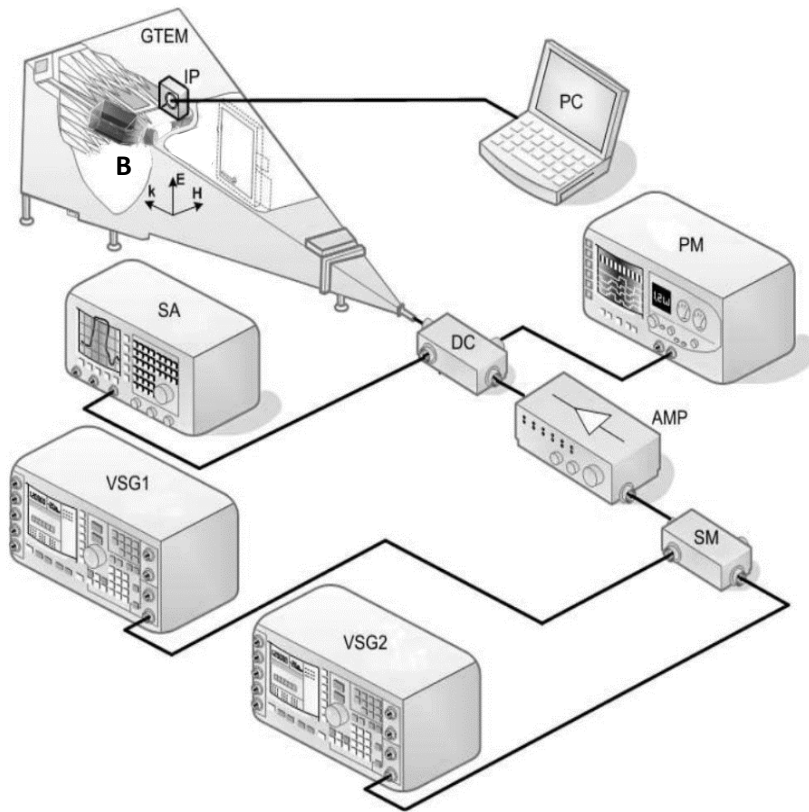


Figura 4. En la figura aparece la representación gráfica del sistema de radiación multifrecuencias para la radiación in vitro de cultivos celulares (López-Furelos y col. 2018).

### 3.1.1. Características del dispositivo de radiación *in vivo*.

#### 3.1.1.1. Protocolo de exposición *in vivo*

Los animales se sacaron de su jaula y se pesaron para verificar que poseían las características idóneas para llevar a cabo el experimento, posteriormente, se inmovilizaron en un cepo cilíndrico de metacrilato transparente y se dejaron en reposo durante 10 min para que descendiese el nivel de estrés del animal. Tras 10 min se introdujeron en la cámara Schaffner 250 GTEM y previamente se seleccionó tanto la frecuencia como la intensidad de la radiación correspondiente al grupo al que pertenecía el animal.

En el interior de la cámara hay un espacio cuadrado de 25x25x25 cm elevado a 5 cm del suelo, donde la radiación de la cámara es máxima en esta localización, se inmoviliza el animal en el cepo sobre un soporte de metacrilato (Fig. 3).

Siguiendo lo marcado por el diseño de los experimentos, cada una de las ratas se mantuvo inmovilizada en el cepo de metacrilato durante una o dos h en la cámara de ensayos electromagnéticos, para posteriormente devolverlas a su jaula. Los grupos de animales expuestos a radiación no ionizante se compararon con grupos de animales control no radiados. Ambos grupos de animales se sometieron a similares características de oscuridad y aislamiento electromagnético, a fin de desestimar la influencia de los factores ambientales y los efectos del estrés causados por la inmovilización de los animales en el experimento.

#### 3.1.1.2. Medición de la temperatura rectal mediante sonda termométrica.

Para poder valorar desde un punto de vista experimental si la radiación constituye un estímulo capaz de provocar un incremento de temperatura y causar ajustes hipotalámicos en la termorregulación (Hirata y col., 2010). Se hicieron mediciones de la temperatura rectal con un termómetro digital (instrumentos Eutech) en todos los animales en cada uno de los distintos grupos inmediatamente antes de colocar el animal en la cámara de radiación e inmediatamente después de la exposición (min 0).

-

### 3.1.1.3. Descripción de las simulaciones.

Los valores de SAR se calcularon con la ayuda de SEMCAD X, un software de simulación basado en el método FDTD. Se utilizó un modelo de rata macho Sprague-Dawley de 198,3 gramos, compuesta por 60 tejidos diferentes, ensamblando secciones de 1,15 mm obtenidas a partir de imágenes de resonancia magnética. La simulación se hizo utilizando una onda plana que incide en la zona izquierda del animal, con el campo magnético H paralelo a su eje principal de la rata.

El valor del campo eléctrico simulado, se midió en cada caso con una sonda isotrópica ubicada en el centro del área donde se situó la rata para exponerla a la radiación. El valor del SAR en cada caso fue estimado ajustando el modelo de la rata macho en el SEMCAD, teniendo en cuenta los promedios de peso existentes entre las ratas utilizadas experimentalmente de los tres grupos de animales radiados. De esta forma, hemos obtenido un ajuste uniforme (multiplicando todas las dimensiones originales del fantoma numérico por el mismo factor), aplicando una constante de proporcionalidad se escaló de manera eficaz el modelo numérico de rata hasta el peso medido.

Dado que los animales fueron expuestos lateralmente en la cámara GTEM, el lado izquierdo del cuerpo (visto desde la puerta de la cámara) experimentó un mayor campo que el lado derecho. Esto se debe al hecho de que el valor del campo eléctrico dentro de la cámara GTEM aumenta a medida que la sección de la cámara se hace más pequeña.

## 3.1.2. Características del dispositivo de radiación *in vitro*

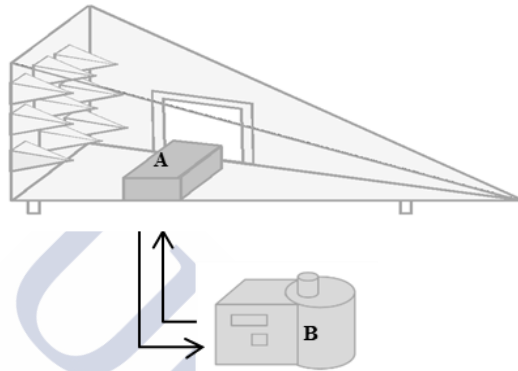
### 3.1.2.1. Desarrollo de un sistema de termorregulación automática.

La utilización de una línea celular como modelo experimental, hizo necesario adaptar un sistema existente, el cual era empleado para la experimentación animal, para los nuevos requerimientos de las células.

La Línea celular RAW 264.7, es una línea celular proveniente de ratones, al ser una línea de mamíferos es necesario mantener una temperatura corporal en torno a  $37.5 \pm 1$  °C para asegurar la supervivencia celular.

Para mantener una temperatura constante de 37,5 °C se diseñó un sistema específicamente adaptado de termorregulación automática. La

La dificultad de adaptar un sistema de regulación de la temperatura a una cámara de radiación es que los elementos metálicos interfieren con las ondas electromagnéticas, con lo cual todos los elementos deben ser plásticos, debido a que los plásticos no interfieren con el sistema de radiación. El sistema desarrollado consta de dos piezas:



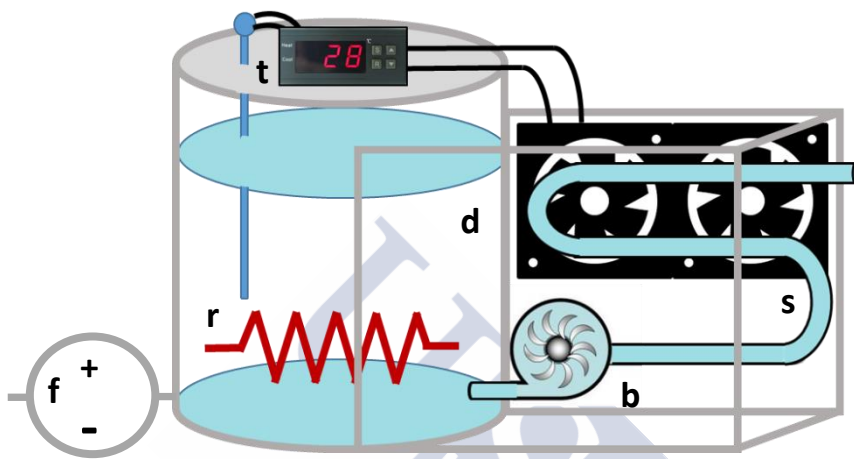
**Figura 5.** Esquema del sistema de mantenimiento de la temperatura. Puede observarse el pedestal calefactado (A) en el interior de la cavidad de radiación y el sistema calefactor externo (B) (López-Furelos y col. 2018).

En el interior de la cámara se sitúa un pedestal fabricado en Policloruro de vinilo (PVC) (Fig.5, A) Este pedestal fue diseñado para elevar los cultivos celulares hasta la posición R. El pedestal funciona como un intercambiador de calor, contiene agua y un serpentín interno de plástico transfiere el calor al agua. Este serpentín está conectado mediante dos tubos a la unidad de calentamiento externa. La pared superior del pedestal se trata de una lámina de PVC de 180 micras que maximiza el intercambio de calor. Sobre este pedestal se depositaron los frascos de cultivo y las placas multipocillo que se emplearon durante la realización de los experimentos con modelos celulares.

En el exterior de la cámara, se sitúa la unidad calefactora (Fig.5, B). El pedestal y la unidad calefactora se conectan mediante dos tubos de poliuretano de 4 mm que envían el agua caliente al pedestal y la retornan. Estos tubos se introducen por una abertura existente en la parte inferior de la cámara GTEM. Esta abertura originalmente se

emplea para pasar los cables de la sonda isotrópica y se encuentra apantallada para impedir el paso de las radiaciones.

Este equipo calefactor consta de (Ver Fig. 6): una resistencia (r) calefactora de 750 W, un serpentín de cobre conectado a un sistema de



**Figura 6.** Esquema del interior de la unidad calefactora. Consta de un termostato (t), un depósito con para el líquido de termorregulación (d), una resistencia calefactora de 750w (r), una fuente de alimentación (f), una bomba que recircula el líquido (b) y un serpentín que refrigera el líquido con ayuda de unos ventiladores (s).

refrigeración por aire (s), un termostato que controla la temperatura (t), una bomba para recircular el líquido (b), una fuente de alimentación de 12 V (f) y un depósito de agua (d).

El termostato controla la activación y desactivación de la resistencia calefactora y de la refrigeración por aire. A su vez, la bomba recircula el líquido por el sistema cerrado llevando el agua hasta el interior del pedestal. Hay que tener en cuenta, que la temperatura que se regula es la del interior del depósito de agua. Existe una desviación importante entre la temperatura en el interior del depósito (49 °C) y la de la superficie del pedestal (37,5 °C) debido a las pérdidas de calor del circuito

Este sistema de dos elementos, nos permite mantener una temperatura constante de  $37,5 \pm 0,5$  °C en la superficie del pedestal, sobre la cual se deposita los frascos de cultivo (Fig5.).

### 3.1.2.2. Dosimetría de la línea celular RAW 264.7.

Los parámetros electromagnéticos y los valores SAR estimados mediante simulación, utilizando el software SEMCAD X basado en FDTD (Schmid & Partner Engineering AG., 2009) de los cultivos celulares, se describen en la Tabla 3.

	$f$ [MHz]	$P_{TR}$ [W]	$E_m$ [V /m]	$P_D$ [W/m <sup>2</sup> ]	Promedio del SAR [W/kg]	
					Platos de 24 pocillos	Frascos de cultivo
GRUPO 1	900	12	96.8	24.9	0.1477	0.2467
GROUP 2	2450	12	102.8	28.0	0.1740	0.4060
GROUP 3	900 + 2450	6 + 6	71.5	13.6	0.0842	0.1834

**Tabla 3.** Condiciones experimentales de los grupos sujetos a radiación.  $f$  frecuencia;  $P_{TR}$ , potencia transmitida,  $E_m$ , medida de la intensidad de campo eléctrico,  $P_D$  densidad de potencia incidente, promedio del SAR, FDTD-calculado mediante FDTD y  $E_m$  (López-Furelos y col. 2018).

### 3.1.2.3. Protocolo de exposición *in vitro*.

Durante la exposición a la radiación se emplearon dos soportes diferentes:

**Frascos de cultivo:** Para llevar a cabo la radiación se introdujeron las células en frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> (ThermoFisherscientific) y se sustituyó el medio de cultivo por L15 suplementado con un 10% de suero bovino fetal inactivado (PAN Biotech). Se expusieron 32 cultivos independientes de la línea celular de macrófagos RAW 264.7 a la radiación de la cavidad GTEM (2 cultivos celulares por cada grupo y tiempo).



**Placas estériles de 24 pocillos:** Para realizar la determinación de la actividad fagocítica, se emplearon 4 placas estériles de 24 pocillos (Corning LifeSciences) en el fondo de los cuales se depositó un cristal cuadrado. Posteriormente se añadió a cada pocillo 2 ml de medio IMDM con una concentración celular de RAW 264.7 de  $1 \times 10^6$  Células/ml y se dejó incubar 24 h para que los macrófagos se adhirieran al vidrio situado en el fondo de los pocillos. Tras estas 24 h, se retiró el medio IMDM y se sustituyó por 3 ml de medio L15. Finalmente, se procedió a la exposición de los grupos radiados (I, II, III) y no radiados (IV) y se extrajeron a 4, 24, 48 y 72 h 6 cristales de cada vez con los macrófagos adherido

### **3.2. MATERIAL PARA CULTIVOS CELULARES *IN VITRO***

#### **3.2.1. Medios de cultivo**

**IMDM (SIGMA):** Es una modificación del medio Eagle modificado de Dulbecco, incluye selenio, así como aminoácidos y vitaminas adicionales. El IMDM no contiene factores de crecimiento. Por lo tanto, el IMDM requiere suplementación con 10 % de suero fetal bovino (SFB) (PAN Biotech). IMDM utiliza un sistema de tampones de bicarbonato de sodio (3,024 g/l) y, por tanto, requiere un ambiente con un 5-10 % de CO<sub>2</sub> para mantener el pH fisiológico.

**LEIBOWITZ L-15 (SIGMA):** El medio L-15 esta tamponado con fosfatos y enriquecido con una cantidad mucho mayor de aminoácidos. En comparación con los otros medios posee vitaminas y otros componentes esenciales para el crecimiento celular. Fue desarrollado para no incluir el uso de estufa de CO<sub>2</sub>, pues su fórmula no contiene bicarbonato como tampón. El L-15 también requiere factores de crecimiento. Por lo que se añadió un 10 % de suero fetal bovino (SFB) (PAN Biotech).

#### **3.2.2. Subcultivo**

En los cultivos sub-confluentes (70-90%) de la línea RAW 264.7, se procede a la eliminación del 90% del medio antiguo, Se resuspenden las células mecánicamente mediante el raspado, se transfieren a nuevos frascos a una concentración 1:3 a 1:6 dependiendo de la concentración

inicial de células obtenidas y se añade medio nuevo a unas condiciones de; 5 % de CO<sub>2</sub>; 37 ° C en medio IMDM. Las células son semi-adherentes, es decir, algunas células crecen en suspensión, algunas se unen vagamente a la superficie y otros se aplanan y se unen al frasco. No se permitió que las células crecieran hasta confluir, ya que si no se pueden producir aberraciones celulares.

### **3.3. OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE TEJIDOS Y CÉLULAS.**

#### **3.3.1. Eutanasia de los Animales**

Después de someter a las ratas a la exposición de la radiación, se dejaron en reposo durante 24 horas. Una vez concluido este tiempo se realizó el sacrificio de los animales para la extracción del tejido, los animales se anestesiaron con una primera inyección intraperitoneal de pentotal sódico para disminuir el posible trauma causado al animal y posteriormente se administró una sobredosis de éter etílico en un contenedor estanco (María Julia y col., 2015).

#### **3.3.2. Extracción del tejido y preparación para estudios de morfología**

Una vez muerto el animal se procedió a la extracción de los tejidos que posteriormente se sumergieron durante 24h en un fijador (formaldehído al 10% en buffer fosfato).

##### **3.3.2.1. Inclusión en Parafina.**

El fijador se cambió transcurridas 4 h de la extracción del tejido para eliminar el agua disuelta y se deja 24 h en una nevera a 20 °C. El testículo, por ser un tejido con alto contenido en agua, es necesario cambiarle el fijador un total de dos veces en períodos de dos horas. Tras 24 h se cambió el fijador por alcohol de 70°, 2 h después se volvió a cambiar el alcohol para eliminar los residuos de agua y por último se dejó 12 h en agitación. Transcurrido este tiempo se realiza un cambio por alcohol de 90° y 2 h después se cambió por alcohol nuevo de 90°, los últimos cambios transcurren cuatro h después, cambiándose el alcohol por uno de 100° y una hora después se volvió a cambiar por otro nuevo de 100°, por último, una h más tarde se cambió dicho alcohol por tolueno y se deja reposar durante 12 h.

Para la inclusión en parafina se realizaron 3 baños. Los dos primeros se realizan con parafina usada y el último con parafina nueva.

*Se llevó a cabo en el experimento I*

#### 3.3.2.2. Cortes de Tejidos.

Posteriormente con el taco de parafina acabado y solidificado se realizaron cortes continuos de 5  $\mu\text{m}$  utilizando un microtomo y recogién dose inmovilizados en un porta-objetos. Se seleccionaron 4 cortes de cada taco de parafina de forma seriada cada 50  $\mu\text{m}$ , alternándose con el almacenamiento, a fin de observar la estructura global del tejido. Se dejaron en una estufa (36 °C) durante al menos 24 h.

*Se llevó a cabo en el experimento I*

#### 3.3.3. Extracción y preparación del tejido para ELISA.

Después del proceso de radiación, las ratas se dejaron en reposo durante 24 h. Una vez concluido este tiempo se realizó el sacrificio de los animales para la extracción del tejido, el método de sacrificio se realizó del mismo modo que en el experimento anterior. Los tejidos fueron colocados directamente en viales de 1,5 ml y almacenados en una nevera a -20 °C hasta el momento de su análisis.

Posteriormente, los viales se descongelaron y se les añadió 0,5 ml de tampón carbonato/bicarbonato con 10  $\mu\text{l/ml}$  de inhibidor de proteasas PMFS para impedir la degradación de las proteínas. Posteriormente se procedió a la homogenización de los tejidos mediante sonicación, aquellos tejidos más duros fueron homogenizados mediante un disgregador de tejidos, musculo y lengua, y su producto fue recuperado.

*Se llevó a cabo en el experimento II*

#### 3.3.4. Preparación de células para citometría de flujo.

Para realizar las técnicas de citometría de flujo, las células de la línea RAW 264.7 fueron resuspendidas en el medio de cultivo (10 ml) de los frascos de cultivo mediante un raspador de plástico y se tomó una alícuota de 1 ml en condiciones de esterilidad. Esto se realizó antes del inicio de la radiación, a las 4, 24, 48 y 72 h de radiación según el tiempo que fuesen radiados los cultivos, de modo que de los cultivos que pasasen más tiempo bajo radiación se extrajeron más alícuotas.

*Se llevó a cabo en el experimento III*

### **3.3.5. Extracción del ARNm.**

Después de la radiación de la línea celular RAW 264.7, se procedió a centrifugar las células (12 muestras por grupo) a 2500 r.p.m. durante 5 min. Posteriormente, se procedió a retirar el medio de cultivo L-15 y se resuspendió el pellet en 1 ml del reactivo TriPure (SIGMA-ALDRICH). A continuación, se añadió 0,2 ml de cloroformo (Merck) y se dejó incubar 10 min tras los cuales se centrifugó a 1200 G 15 min y 4 °C. Se descartó la fase que contenía el ADN, proteínas y restos celulares y se continuó tratando la fracción que contenía el ARN. Para la eliminación de los restos del reactivo TriPure se realizó un paso de dos alcoholes empezando por el isopropil alcohol (Merck) y etanol de 70% (Merck), centrifugando después de cada lavado. El resultado fue de un pellet deshidratado blanquecino que se almacenó a -70°C.

*Se llevó a cabo en el experimento III.*

### **3.3.6. Extracción de sobrenadante celular.**

Después de la radiación, a las 48 y 72 horas, se tomó una fracción de 400 µl del medio de los frascos de cultivo y se pipetearon en una placa de 96 pocillos añadiendo 100 µl por pocillo. También se tomó paralelamente a cada una de las extracciones las mismas cantidades del grupo control que procediese. Debido a que se utilizaron 2 cultivos celulares por grupo / tiempo, cada grupo / tiempo tendrá 8 pocillos dando como resultado un total de 9 filas de 8 pocillos usadas. 3 filas de grupos control, 3 filas de grupos radiados a 48 h a las 3 frecuencias diferentes y 3 filas de grupos radiados a 72 h a las 3 frecuencias diferentes.

*Se llevó a cabo en el experimento III.*

### **3.3.7. Preparación del ensayo de actividad fagocítica.**

Una vez finalizada la radiación de la placa de 24 pocillos, los vidrios se depositaron en una nueva placa en las que se añadieron 750 µl de medio que contenía 1.5 mg/ml de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* previamente liofilizadas, dejando incubar 2h.

*Se llevó a cabo en el experimento III.*

## **3.4. TÉCNICAS DE TINCIÓN.**

### **3.4.1. Tinción con Hematoxilina-Eosina.**

Los tejidos preparados para morfología fueron desparafinados incubándolos en una estufa a 60° durante 30 min, posteriormente se rehidrataron pasando previamente por Xilol (5 min) 2 veces, alcohol de 100° (5 min) 2 veces, alcohol de 96° dos veces, alcohol de 70° (5 min) una vez, agua destilada (10 min), se sumergen en hematoxilina durante (10 min), se lavaron con una corriente continua de agua del grifo durante (10 min) y por último se introducen en Eosina durante (5 min). Antes de montar las muestras hay que volver a secarlas, esto se hizo con un paso rápido por alcoholes durante 1 min, 2 veces 90°, 2 veces 100° y 2 veces Xilol. Una vez realizado esto se usa un medio de montaje (Entellan) y se cubren.

*Se llevó a cabo en el experimento I.*

### **3.4.2. Tinción de los núcleos con DAPI.**

Los tejidos preparados para morfología se desparafinaron incubándolos en una estufa a 60° durante 30 min, posteriormente se rehidrataron mediante el paso por Xilol 3 min 2 veces, alcohol de 100° 3 min 2 veces, alcohol de 96° 3 min dos veces, alcohol de 70° 3 min una vez y por último agua destilada durante 5 min.

Los cortes se incubaron con 0.8 mg/ml de 6-diamidine-20-phenylindole dihydrochloride (DAPI; Sigma-Aldrich) en PBS durante 15 min a temperatura ambiente y por último se lavaron varias veces con PBS. Posteriormente los cortes teñidos con DAPI se observaron con un microscopio de fluorescencia Zeiss Axioplan (Alemania), excitando la muestra a 358 nm y observando la emisión a 461 nm.

*Se llevó a cabo en el experimento I.*

### **3.4.3. Tinción de la línea RAW 264.7 con Giemsa para el ensayo de actividad fagocítica.**

Transcurrido este tiempo de incubación de las células RAW 264.7 con las levaduras liofilizadas, se realizaron 3 lavados de PBS para eliminar el exceso de levaduras. Se incubó durante 5 min con metanol al 100% y posteriormente se dejó secar a 20 °C. El siguiente paso consistió en la tinción de las células y las levaduras mediante el colorante Giemsa. Se dejó al 100% de concentración durante 2 min y al 50% durante 1 min. Tras lo cual, se realizaron 3 lavados con agua del grifo y se procedió a montar la preparación con Entellan y se procedió

al recuento de las células que contenían levaduras fagocitadas dentro de las vacuolas fagocíticas citoplasmáticas (para el cálculo del porcentaje de fagocitosis) y el número de levaduras que contenía cada célula (para el cálculo del índice de fagocitosis) en un microscopio óptico (Nikon Eclipse E600, Japón).

*Se llevó a cabo en el experimento III.*

### 3.5. TÉCNICA DE ELISA

Se tomó 1µl de las muestras previamente preparadas para esta técnica y se contabilizó su concentración total de proteínas mediante un espectrofotómetro (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific).

Una vez realizado la cuantificación, se tomó la proporción necesaria de muestra y se diluyó con tampón carbonato/bicarbonato hasta alcanzar una concentración de 0,5µg de proteína en 100µl.

Las placas escogidas para este experimento fueron multipocillo de 8 x 12. En cada placa se colocó el mismo tejido de todos los grupos y ratas. Cada muestra se realizó por triplicado dentro de la misma placa. Además, como control de que el ensayo está bien realizado, en cada placa se añadieron dos controles: un control positivo perteneciente a células humanas HL60 y un control negativo que carecía de muestra. De cada tejido se realizaron tres placas, una correspondiente al uso del anticuerpo para detectar Hsp70, otra correspondiente al anticuerpo para detectar Hsp90 y otra correspondiente al anticuerpo para detectar la caspasa-3.

**Acoplamiento:** De las diluciones anteriores se depositan 100 µl en cada pocillo y se dejan incubar toda la noche en una cámara fría a 40°

**Bloqueo:** Al día siguiente se realizaron dos lavados con TBS-Tween al 0,05%, posteriormente se añaden 150 µl de TBS-Tween al 0,2 con un 5% de leche descremada para impedir que los anticuerpos que se van a añadir posteriormente se unan al fondo del pocillo. Se deja incubando durante 2 h en una estufa a 37 °C.

**Anticuerpo primario:** Se añadió en cada pocillo 100 µl de TBS-Tween al 0,2% que tenía diluido al 1/250 un anticuerpo policlonal de conejo, anti-Hsp70, anti-Hsp90 o anti-Caspasa 3. Se dejó incubando durante 1 h y 30 min en una estufa a 37 °C.

**Anticuerpo secundario:** Se realizaron 4 lavados con TBS-Tween al 0,05% esperando 5 min entre cada lavado, posteriormente se añadieron 100 µl de TBS-Tween al 0,2% que tenía diluido al 1/500 un anticuerpo de cabra anti-conejo y que llevaba conjugado HRP (*peroxidasa de rábano*). Se deja 1 h incubando en una estufa a 37 °C.

**Revelado:** Se realizaron 2 lavados con TBS-Tween al 0,05% y 2 lavados con TBS sin Tween, esperando 5 min entre cada lavado. Los pocillos se lavaron cinco veces en TBS, luego se trataron con 100 µl del revelador basado en una mezcla 50/50 de luminol/peróxido de hidrogeno para la detección de la actividad enzimática de la peroxidasa de rábano picante (Pierce ECL Werten Blotting substrate, Thermo Scientific). Después de 3 minutos de incubación a 37°C. Los resultados se obtuvieron en un luminómetro (*Multi-detection microplate reader*, FLx 800, Biotek, USA)

*Se llevó a cabo en el experimento II.*

### 3.6. ESTUDIO DE LA VIABILIDAD Y CURVA DE CRECIMIENTO

Para realizar el estudio de la viabilidad y la curva de crecimiento, se emplearon las células previamente preparadas para este fin y se usó el equipo Cell Analyzer Muse siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante usando el fluorocromo Yoduro de propidio (SIGMA). Analizando el número de células/ml a cada uno de los diferentes tiempos en un equipo de citometría de flujo (*Muse Cell Analyzer*, Millipore, USA).

*Se llevó a cabo en el experimento III.*

### 3.7. PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO

Para realizar esta técnica usamos el reactivo de Gries que se compone de Ácido fosfórico al 5%, sulfanilamida 0.5% y Naftiletilendiamida 0.05% realizamos una recta patrón usando como referencia Nitrito Sódico. Sobre cada muestra (8 muestras por grupo/tiempo) preparadas anteriormente, añadimos el reactivo en relación 1:1 (v/v), la reacción requiere una incubación de 10 min. Tras la incubación, se leyó la absorbancia obtenida a 530 nm en un



espectrofotómetro lector de placas (*Absorbance Microplate Reader* Elx808, Biotek, USA).

*Se llevó a cabo en el experimento III.*

### **3.8. DETECCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE HSP70 Y TNF- $\alpha$ .**

La evaluación del nivel de expresión de los genes que codifican la HSP70 y el TNF- $\alpha$  se llevó a cabo mediante una técnica que transforma el ARN obtenido de las muestras en ADNc mediante una reacción empleando una retrotranscriptasa inversa (rt) seguida de una ampliación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real (qPCR).

**Tratamiento con DNasa:** El pellet almacenado anteriormente a  $-70^{\circ}\text{C}$  se hidrató en con  $\text{H}_2\text{O}$  con Dietilpirocarbonato (SIGMA-ALDRICH). y dejó incubar durante 15 min a  $60^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se efectuó la cuantificación del ARN usando el equipo NanoDrop ND-1000. Se añadió 4  $\mu\text{g}$  de ácidos nucleicos. Para el tratamiento con DNasa se utilizó el kit comercial (ThermoFisherscientific) consistente en DNasaI y tampón de reacción con 2.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , tras incubar durante 30 min a  $37^{\circ}\text{C}$  la acción de la enzima se detuvo con EDTA 50mM también presente en el kit.

**rtPCR:** De la muestra de ARN puro, se toman 200ng y se añade 1.25  $\mu\text{M}$  random hexamer primers (Roche) y 250  $\mu\text{M}$  deoxinucleosidostrifosfato (dNTPs) se dejan incubar a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 5 min. A continuación, se añadió más reactivos pertenecientes al kit GeneAmp® ARN PCR (ThermoFisherscientific) que consta de 200U de MMLV (Moloneymurineleukemia virus) reverso transcriptasa (Promega) en buffer de reacción 30 mM Tris and 20 mM KCl (pH 8.3) e inhibidor de la ribonucleasa. A continuación, se introdujo en un termociclador en el que se introdujo el siguiente programa:  $25^{\circ}\text{C}$  5min,  $37^{\circ}\text{C}$  50 min y  $70^{\circ}\text{C}$  15 min. Como resultado obtuvimos el ADNc del ARNm total.

**qPCR:** Una vez se sintetiza el ADNc, procedimos a realizar la PCR cuantitativa en la cual se realizó el estudio de la expresión de los genes de factor de necrosis tumoral



$\alpha$  (TNF- $\alpha$ ): forward/reverse primer 5'-  
AGCCCCAGTCTGTATCCTT -3'/ 5'-  
CTCCCTTTGCAGAACTCAGG-3', y la chaperona  
HSP70 forward/reverse primer pair 5'-  
CATCATCAATGAGCCCACAG-3'/5'-  
TCTTGTGTTTGCCTTGAAC-3 usando en cada caso la  
 $\beta$ -actina (ACT) forward/reverse primer pair 5'-  
AGCCATGTACGTAGCCATCC-3'/ 5'-  
CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA-3'; ACT se usó para  
normalizar los datos, los cuales se expresó en relative  
arbitrary units. Cada muestra se introdujo por triplicado en  
una placa multipocillo y en cada pocillo se introdujo los  
primer forward y reverse del gen de interés en cada caso  
además de la muestra ADNc a analizar, así como el  
cromógeno kapas y br fast (kapabiosystems) La  
amplificación se realizó en el equipo EcoTM (Illumina).

*Se llevó a cabo en el experimento III.*

### 3.9. CUANTIFICACIÓN Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.

#### 3.9.1. Análisis de los resultados mediante Microscopía óptica.

##### 3.9.1.1. Análisis cualitativo de los tejidos teñidos mediante HE

Las preparaciones de los 8 tejidos animales de los 5 grupos experimentales radiados teñidos con Hematoxilina-Eosina se observaron mediante un microscopio Nikon ECLIPSE E2000 a una resolución de 40 ó 100X según fuese necesario. Se procedió a realizar una valoración cualitativa del estado de los tejidos en comparación con el grupo control negativo (GIV) y el grupo control positivo (GV).

*Se llevó a cabo en el experimento I*

##### 3.9.1.2. Análisis cualitativo, cuantificación y análisis estadístico de los tejidos teñidos con DAPI.

Se analizó los posibles cambios en la morfología de los núcleos en relación a la apoptosis con un microscopio de fluorescencia a 100X mediante la tinción DAPI en 8 tejidos de rata macho. Se cuantificaron de cada grupo un total de 500 células las cuales fueron agrupadas en células normales o células apoptóticas.

Se usó un ANOVA de una vía para evaluar las diferencias significativas entre grupos. El factor considerado fue la interacción de uno o más frecuencias.

*Se llevó a cabo en el experimento I*

#### 3.9.1.3. Cuantificación y análisis estadístico de la actividad Fagocítica.

Para realizar el recuento de la actividad fagocítica, se empleó un microscopio Nikon ECLIPSE E2000 a una resolución 100x. Se midieron 900 células en cada uno de los grupos (I, II, III, IV) y para cada uno de los tiempos estudiados (4, 24, 48 y 72 h). Finalmente realizamos el porcentaje del recuento de los macrófagos que tenían internalizadas levaduras con respecto a los que no, en cada grupo a estudio y en los distintos tiempos expuestos a la radiación.

Los resultados de la tasa de actividad fagocítica fueron analizados utilizando un two-way ANOVA. Los factores considerados fueron las diferentes frecuencias / sin radiación y tiempo de exposición. Posteriormente se aplicó la prueba Holm-Sidak para comparaciones múltiples.

*Se llevó a cabo en el experimento III*

#### 3.9.2 Análisis estadístico de los datos de temperatura rectal.

Se usó un ANOVA de dos vías para evaluar los niveles estrés en relación a la temperatura. Los factores considerados fueron la interacción de uno o más frecuencias y los cambios de temperatura antes y después de la radiación.

*Se llevó a cabo en el experimento II*

#### 3.9.3. Cuantificación y análisis estadístico de los datos de ELISA.

La luminiscencia de las placas se leyó en un fluorómetro/luminómetro (FLx800, Biotek), y los resultados se expresaron en unidades de luz relativa (RLU). Una vez medido el total de absorbancia de las placas de ELISA. se restó a la medida de absorbancia de cada pocillo el valor del blanco obteniendo el resultado final.

De cada del valor de cada muestra por triplicado se realizó una media y se introdujo por grupos en el programa Sigma Plot que realiza

un análisis de un ANOVA paramétrico (supone que las desviaciones estándar son iguales) de una vía combinado con el test de Tukey que permite la comparación de las diferencias entre los grupos de cada tejido. En caso de que las desviaciones estándar no fuesen iguales usamos un ANOVA no paramétrico combinado con el test de Kruskal-Wallis. Para la representación gráfica de los resultados en histogramas, a partir de los datos de desviación estándar y media de cada grupo y tejido calculado por el GraphPad InsStat, el programa Microcal Origin. El nivel de significación considerado es  $p < 0.05$ , siendo  $p < 0.01$  extremadamente significativo.

*Se llevó a cabo en el experimento II*

#### **3.9.4. Análisis de los datos de crecimiento y viabilidad celular.**

Los datos de crecimiento celular se obtuvieron a partir de los valores de las medias de la concentración celular (6 muestras por grupo) y posteriormente se compararon las pendientes de las ecuaciones de la recta resultantes de la representación gráfica del crecimiento (concentración/tiempo) de cada uno de los cultivos sometidos a radiación.

A) Se utilizó one-way ANOVA para evaluar los cambios en el crecimiento celular en relación a la exposición a la radiación. Los factores considerados fueron la interacción de una o más frecuencias en comparación con el grupo no radiado.

B) Se utilizó two-way ANOVA para evaluar los cambios en la viabilidad en relación a la exposición a la radiación. Los factores considerados fueron la interacción de una o más frecuencias y diferentes exposiciones temporales. Posteriormente se aplicó la prueba Holm-Sidak para comparaciones múltiple

*Se llevó a cabo en el experimento III*

#### **3.9.5. Análisis de los datos de producción de óxido nítrico.**

La absorbancia de cada uno de los pocillos fue obtenida mediante un lector de absorbancia en microplacas a 530 nm.

Los resultados obtenidos de absorbancia del NO se analizaron mediante un two-way ANOVA. Una vez más los factores considerados

fueron la interacción de una o más frecuencias y la exposición al tiempo diferente, pero en esta prueba se consideraron 48 h y 72 h. La prueba de Holm-Sidak para comparaciones múltiples se aplicó posteriormente.

*Se llevó a cabo en el experimento III*

### **3.9.6. Análisis de los datos de PCR.**

Los datos obtenidos mediante el equipo EcoTM se normalizaron empleando los valores de proteína  $\beta$ -Actina para cada amplificación de la qPCR.

Los resultados de los niveles de expresión obtenidos de las proteínas Hsp70 y TNF- $\alpha$  se trataron mediante un ANOVA de doble vía, teniendo en cuenta el tiempo de exposición y la interacción de una o más frecuencias. Posteriormente se aplicó la prueba Holm-Sidak para comparaciones múltiples. Se aplicaron transformaciones logarítmicas naturales a los datos según se necesitaran para obtener la normalidad y homocedasticidad.

*Se llevó a cabo en el experimento III*

## **3.10. DISEÑO EXPERIMENTAL**

Esta Tesis consta de 3 experimentos divididos en dos grupos experimentales.

### **3.10.1. Grupo experimental A: *Efectos agudos causados por la exposición a radiación de frecuencias combinadas en tejidos de rata Sprague-Dawley. Efectos morfológicos y de estrés celular.***

#### **3.10.1.1. Experimento I: *Un sistema experimental multi-frecuencia para estudiar la dosimetría y efectos agudos sobre la morfología celular y nuclear en tejidos de rata.***

En este experimento estudiamos los cambios morfológicos existentes 24h después de una exposición aguda en 7 tejidos de rata: cerebro, cerebelo, hipófisis, timo, trapecio, grasa interescapular, testículo y lengua. Durante el procesamiento de estos tejidos se emplearon técnicas para detectar cambios en la morfología celular y nuclear, haciendo especial hincapié en esta última, las técnicas realizadas fueron la tinción con Hematoxilina-Eosina y DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol).

Se emplearon un total de  $N = 46$  ratas macho Sprague-Dawley. 40 de ellas se distribuyeron de manera equivalente en 4 grupos experimentales de 10 animales cada uno. Las 6 restantes se incluyeron en un grupo adicional a fin de poder comparar los efectos del experimento con un control positivo.

A continuación, se describe cada uno de los grupos:

**Grupo I:** Los animales se inmovilizaron y se expusieron a una radiofrecuencia de 900 MHz y  $P_{TR} = 2$  W durante 1 h en una cámara Schaffner 250 GTEM (gigahertz transverse electromagnetic). 24 h después de la radiación se sacrificaron.

**Grupo II:** Los animales se inmovilizaron y se expusieron a una radiofrecuencia de 2450 MHz y  $P_{TR} = 2$  W durante 1 h en una cámara Schaffner 250 GTEM. 24 h después de la radiación se sacrificaron.

**Grupo III:** Los animales se inmovilizaron y se expusieron a una radiofrecuencia combinada de 900 MHz a  $P_{TR} = 1$  W y 2450 MHz a  $P_{TR} = 1$  W durante 1 h en una cámara Schaffner 250 GTEM. 24 h después de la radiación se sacrificaron.

**Grupo IV:** Está constituido por ratas inmovilizadas en una cámara Schaffner 250 GTEM sin ser expuestas a radiación (control negativo) durante 1 h. Constituye el control negativo de la radiación no ionizante.

**Grupo V:** Se expuso un grupo de ratas a radiación gamma (radiación ionizante) en todo el cuerpo a una dosis de 2 Greys durante 5 min para poder comparar los efectos lesivos y actividad apoptótica. 6 h después de la radiación ionizante se sacrificaron. Constituye el control positivo de la radiación no ionizante.

#### 3.10.1.2. Experimento II: *Evidencia del estrés celular y de la caspasa-3 resultante de una señal combinada de dos frecuencias en el cerebro y el cerebelo de ratas Sprague-Dawley.*

En este experimento estudiamos los cambios morfológicos existentes 24 h después de una exposición aguda en dos tejidos del SNC de ratas Sprague-Dawley: Cerebro, cerebelo. Para evaluar el daño celular, se cuantificaron las proteínas de estrés térmico Hsp90, Hsp70 y

la enzima preapoptótica caspasa-3 mediante la técnica de ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Para valorar los niveles de estrés de los animales se midió mediante sonda térmica la temperatura rectal antes y después de la radiación.

En este segundo experimento se emplearon un total de  $N = 40$  ratas macho Sprague-Dawley divididas de forma equivalente entre cada uno de los grupos / protocolos resultando un total de 5 ratas en cada uno de los grupos / protocolo.

Los tejidos empleados para la realización de este experimento fueron cerebro y cerebelo.

Se realizaron dos protocolos experimentales separados temporalmente de la siguiente forma:

**Protocolo 1:** Los tres grupos experimentales (I-III) fueron expuestos en la cámara GTEM durante una hora a una potencia de 2 W. En este protocolo se emplearon un total de  $N = 20$  ratas divididas en grupos de 5 equivalente entre los cuatro grupos.

**Grupo I:** Radiación a 900MHz  $P_{TR} = 2$  W en una cámara Schaffner 250 GTEM.

**Grupo II:** Radiación a 2450 MHz  $P_{TR} = 2$  W en una cámara Schaffner 250 GTEM.

**Grupo III:** Se radiaron simultáneamente a 900MHz  $P_{TR} = 1$ W y 2450MHz  $P_{TR} = 2$ W en una cámara Schaffner 250 GTEM.

**Grupo IV:** Está constituido por ratas inmovilizadas en una cámara Schaffner 250 GTEM sin ser expuestas a radiación (control negativo).

**Protocolo 2:** Los tres grupos experimentales (I-III) se expusieron en la cámara GTEM durante dos h a una potencia de 4 W. En este protocolo se emplearon un total de  $N = 20$  ratas divididas en grupos de 5 equivalente entre los cuatro grupos.

**Grupo I:** Radiación a 900MHz  $P_{TR} = 4$  W en una cámara Schaffner 250 GTEM.

**Grupo II:** Radiación a 2,45 GHz  $P_{TR} = 4$  W en una cámara Schaffner 250 GTEM.

**Grupo III:** Se Radiaron simultáneamente a 900MHz  $P_{TR} = 2$  W y 2450MHz  $P_{TR} = 2$  W en una cámara Schaffner 250 GTEM.

**Grupo IV:** Está constituido por ratas inmovilizadas en una cámara Schaffner 250 GTEM sin ser expuestas a radiación (control negativo).

Todos los animales 24 h después del periodo de la exposición a la radiación no ionizante fueron sacrificados se sacrificaron bajo anestesia (1 mg/kg).

### **3.10.2. Grupo experimental B: *Efecto de la radiación repetida con exposición a multifrecuencias en la línea celular RAW 264.7.***

3.10.2.1. Experimento III: *La exposición a la radiación de radio-frecuencias simples o combinadas provoca la disfunción de los macrófagos en la línea celular RAW 264.7.*

En este experimento nos centramos en un modelo *in vitro* en el cual medimos la viabilidad y el crecimiento celular, el estrés oxidativo a través de la cuantificación del óxido nítrico, la determinación de la expresión de las proteínas Hsp70, TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor) y la actividad fagocítica de los macrófagos. Para ello se eligió la línea celular de macrófagos RAW 264.7 la cual que se cultivó y se sometió a radiación en dos soportes diferentes, atendiendo a las técnicas que se iban a emplear en cada caso:

A) 32 cultivos independientes expuestos en Frascos de cultivo repartidos de manera equivalente entre cada uno de los grupos / tiempos experimentales (2 frascos por grupo / tiempo)

B) 4 placas estériles de 24 pocillos cada una radiada a una frecuencia diferente (más el grupo no radiado). Cada placa proviene de 1 cultivo madre dividido en 24 pocillos de los cuales se tomaron 6 pocillos para cada tiempo cada tiempo.

Los grupos experimentales se dividieron de acuerdo al siguiente esquema experimental:

**Grupo I:** Cultivos celulares radiados a 900 MHz  $P_{TR}$  = 12 W en una cámara Schaffner 250 GTEM

**Grupo II:** Cultivos celulares a 2450 MHz y  $P_{TR}$  = 12 W en una cámara Schaffner 250 GTEM.

**Grupo III:** Cultivos celulares radiados a 900 MHz y 2450 MHz  $P_{TR}$  = 6 + 6 W respectiva y simultáneamente en una cámara Schaffner 250 GTEM.

**Grupo IV:** Cultivos control no radiados.

A su vez, estos 4 grupos se subdividieron atendiendo al tiempo de exposición (4 h, 24 h, 48 h o 72 h) resultando un total de 16 grupos experimentales.

### 3.11. CONFLICTO DE INTERESES

El autor declara que no existe conflicto de intereses alguno en relación a esta tesis.



## IV. RESULTADOS

### **4.1. RESULTADOS DEL EXPERIMENTO I: *UN SISTEMA EXPERIMENTAL MULTI-FRECUENCIA PARA ESTUDIAR LA DOSIMETRÍA Y EFECTOS AGUDOS SOBRE LA MORFOLOGÍA CELULAR Y NUCLEAR EN TEJIDOS DE RATA.***

Los pocos estudios que han desarrollado en esta área no identificaron claramente potenciales riesgos para la salud en relación con exposiciones a múltiples RF: no se ha establecido una relación entre la exposición a multifrecuencias y alteraciones celulares en embriones durante la gestación (Lee y col., 2009), alteración de la función testicular (Lee y col., 2012), efectos tóxicos o carcinogénicos (Lee y col., 2011; Jin y col., 2011), o síntomas crónicos como dolores de cabeza o alteraciones del sueño en adultos (Thomas y col., 2008a) y niños (Thomas y col., 2008b). Sin embargo, la escasez de información sobre los posibles efectos biológicos de la exposición a múltiples señales de RF contrasta con la preocupación del público en general y de diversas entidades gubernamentales (ICNIRP, 1998; Genc y col., 2010).

En este estudio, buscamos 1) desarrollar un sistema para la exposición experimental simultánea de pequeños animales a múltiples señales de RF; 2) obtener estimaciones de SAR para varios tejidos de ratas expuestas con el sistema de señales simultáneas a las frecuencias utilizadas habitualmente por la tecnología inalámbrica de los sistemas de comunicación, 900 y 2450 MHz; 3) observar el estado y si hay presencia de apoptosis en los tejidos de rata expuestos experimentalmente; y 4) examinar la posible correlación entre el daño tisular y las estimaciones de absorción basadas en el SAR. Se obtuvieron estimaciones de SAR mediante cálculos de FDTD usando el software comercial SEMCAD (Schmid & Partner, 2009) con un fantoma numérico de rata.

#### **4.1.1. Estimación del SAR.**

En la cámara GTEM, la posición óptima de colocación de las ratas se encuentra donde la altura del septum sobre el suelo de la cámara es de 0.215 m.

Las Figs. 7, 8 y 9 muestran la distribución del SAR promedio en 1 g de en un fantoma numérico de rata para las radiofrecuencias de 900 MHz, 2450 MHz y la combinación de ambas frecuencias. La asimetría en el apantallamiento del lado derecho de la rata causado por su lado izquierdo, se suma resultando la distribución asimétrica de los órganos.

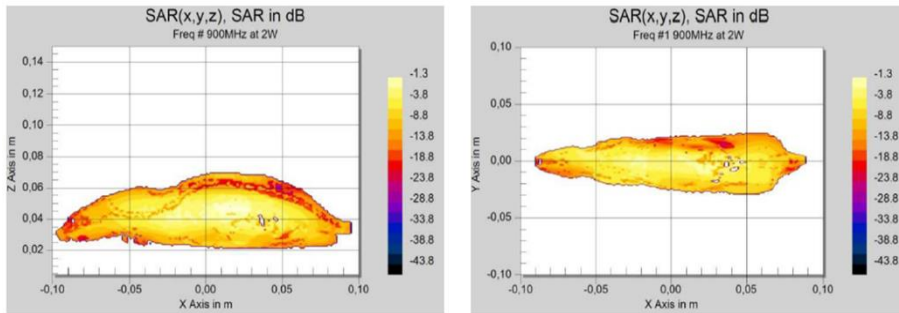
La Tabla 4 enumera las condiciones experimentales, los pesos y los valores máximos estimados de SAR, para el cuerpo de la rata, obtenidos en los diversos grupos experimentales, la Tabla 5 muestra los valores máximos estimados de SAR en los tejidos individuales.

#### **4.1.2. Resultados histopatológicos.**

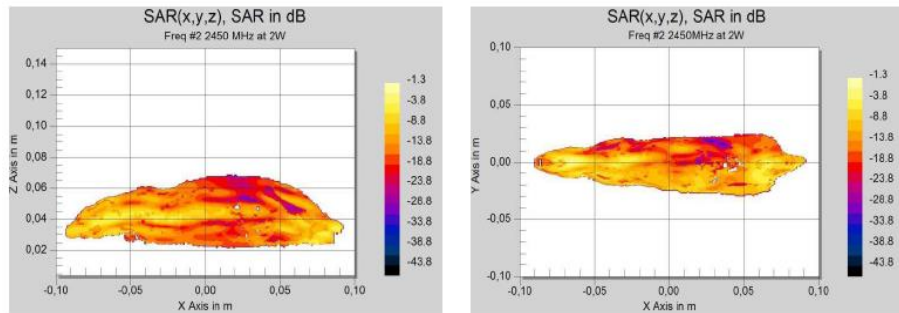
##### **4.1.2.1. Secciones teñidas con hematoxilina-eosina.**

En la Figura 10 se muestran en detalle ocho tejidos de rata examinados en secciones teñidas con hematoxilina-eosina. En todos los casos, el daño evidente causado por la radiación gamma en el grupo 5 contrasta con la ausencia o casi ausencia de signos patológicos en los tejidos de los otros grupos (Fig. 10).

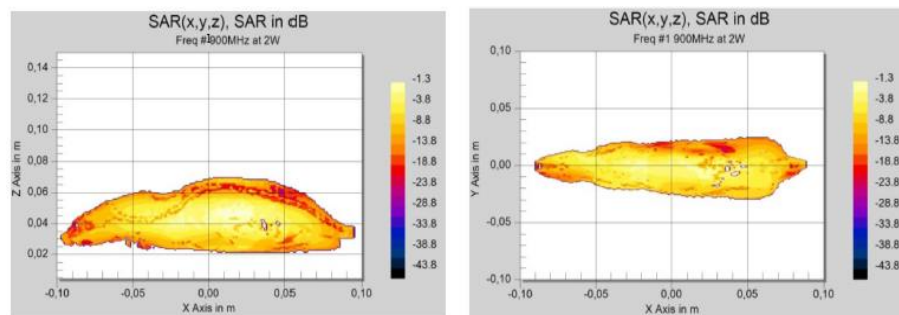
Los grupos 1-4 los tejidos del sistema nervioso central (corteza cerebral, el cerebelo e hipófisis) mostraron a lo sumo restos de hemorragia (glóbulos rojos aislados), sin un aumento de las dark neuronas o signos visibles de apoptosis. Por el contrario, las secciones del grupo 5 mostraron hemorragia significativa, un aumento de las dark neuronas y, en las neuronas de la corteza cerebral, agregados intracitoplásmicos. En el grupo 5, los signos de apoptosis y destrucción neuronal en estos tejidos incluyeron la disminución del tamaño de los núcleos de las neuronas pituitarias y un menor número de células de Purkinje en el cerebelo.



**Figura 7.** Distribución del SAR promedio de 1 g en secciones verticales y horizontales del fantoma numérico de rata cuando se radia a 900 MHz ( $P_{TR} = 2$  W). El SAR se expresa en relación a la absorción de toda la densidad de potencia local en ausencia de la rata (López-Furelos y col. 2012).



**Figura 8.** Distribución del SAR promedio de 1 g en secciones verticales y horizontales del fantoma numérico de rata cuando se radia a 2450 MHz ( $P_{TR} = 2$  W). El SAR se expresa en relación a la absorción de toda la densidad de potencia local en ausencia de la rata (López-Furelos y col. 2012).



**Figura 9.** Distribución del SAR promedio de 1 g en secciones verticales y horizontales del fantoma numérico de rata cuando se radia a 900 MHz ( $P_{TR} = 1$  W) y 2450 MHz ( $P_{TR} = 1$  W). El SAR se expresa en relación a la absorción de toda la densidad de potencia local en ausencia de la rata (López-Furelos y col. 2012).

	$f$ [MHz]	$P_{TR}$ [W]	$E_m$ [V/m]	$W_E$ [g]	$SAR_E$ [W/kg] (Cuerpo entero)
GRUPO 1	900	2	47.5	Min. 182.9	0.1587
				Max. 218.8	0.1898
				Mean 198.7	0.1718
GRUPO 2	2450	2	40.2	Min. 198.1	0.0601
				Max. 243.7	0.0740
				Mean 224.7	0.0683
GRUPO 3	900 + 2450	1 + 1	34.4	Min. 153.4	0.0879
				Max. 306.3	0.1755
				Mean 230.8	0.1322

**Tabla 4.** Condiciones experimentales, pesos y SAR pico promedio de 1 g estimados para todo el cuerpo de los grupos experimentales sometidos a radiación de RF (López-Furelos y col. 2012).

<sup>a</sup>  $f$ , frecuencia;  $P_{TR}$ , potencia transmitida;  $E_m$ , medida de la intensidad de campo eléctrico.

TEJIDO	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3
HEMISFERIOS CEREBRALES	0.0902	0.0749	0.1009
HIPÓFISIS	0.2088	0.2633	0.3139
CEREBELO	0.2152	0.0981	0.1551
MUSCULO TRAPECIO	0.1601	0.0654	0.1130
TIMO	0.2880	0.0637	0.1755
TESTÍCULO	0.0902	0.2870	0.2165
GRASA INTERSCAPULAR	0.0323	0.0195	0.0266
LENGUA	0.1215	0.2402	0.1740

**Tabla 5.** Promedio estimado, por grupo, del SAR pico de 1 g de los tejidos (López-Furelos y col. 2012)

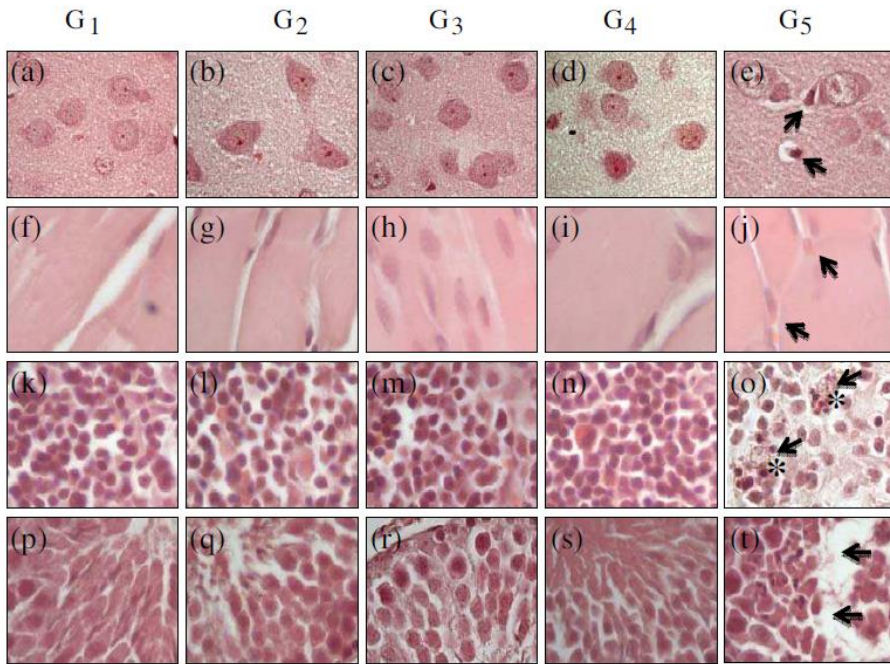
Las secciones de tejido de lengua de los animales del grupo 5 mostraban signos de lesiones que incluían la hemorragia y la presencia de macrófagos en la capa de la submucosa, una disminución del espesor del epitelio y un aumento en el número de núcleos apoptóticos. Los animales de los grupos 1-4 no mostraron signos visibles de lesiones celulares, hemorragia o apoptosis en la mucosa o a nivel muscular.

El tejido de grasa interescapular de los grupos 1-4 exhibió la típica morfología hexagonal de los adipocitos en diferentes fases de desarrollo, junto con células de grasa no diferenciadas. En el grupo 5, los adipocitos habían perdido su morfología hexagonal y se habían encogido, había menos adipocitos en fase temprana y la hemorragia era abundante.

En el tejido del musculo trapecio de los grupos 1-3 los núcleos conservaron su morfología, no presentaban signos de destrucción celular o hemorragia, y en todos los demás aspectos eran similares a los del grupo 4, en marcado contraste con la destrucción celular, abundante hemorragia, cambios morfológicos y disgregación de los núcleos del tejido muscular del grupo 5.

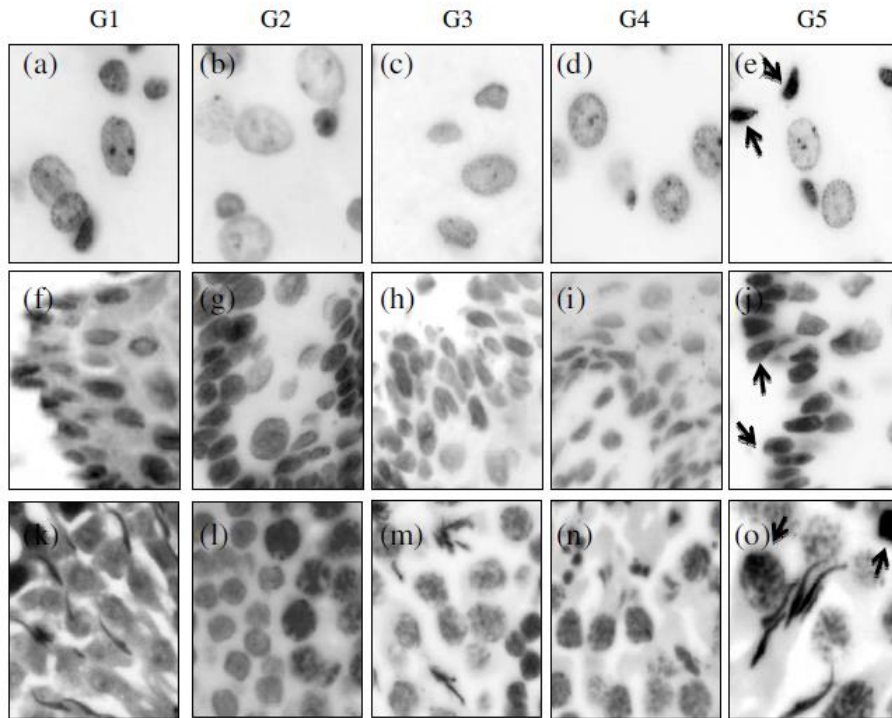
En los grupos 1-4 la morfología externa de la corteza y la médula del timo era normales, al igual que las poblaciones de linfocitos y los corpúsculos de Hassall. Las células reticuloendoteliales fueron pocas (más abundantes en el grupo 3), los macrófagos aislados no activos aparecieron esporádicamente. El timo de las ratas del grupo 5 mostró claros signos de hemorragia en la corteza y la médula, junto con cambios en la estructura medular que consisten en un aumento del tejido conectivo y una disminución de la celularidad. El grupo 5 también mostró una mayor actividad autoinmune, con abundantes macrófagos activos y un aumento de las células retículo-epiteliales en todas las capas.

En las secciones de testículo la dinámica de la espermatogénesis de los animales del grupo 1-4 se comprobó mediante la observación de espermátocitos en diferentes etapas de desarrollo. El tejido testicular del grupo 5 exhibió más espermátocitos primarios, pero apenas espermátidas avanzadas en los conductos seminíferos, junto con una disminución de la espermatogénesis y un aumento de la apoptosis celular y del número de núcleos fragmentados.



**Figura 10.** Secciones de tejido teñidas con hematoxilina-eosina, que muestran la corteza cerebral (a)-(e), músculo trapecioide (f)-(j), timo (k)-(o) y conductos seminíferos testiculares (p)-(t) de ratas de los grupos 1-5 (columnas G1-G5, respectivamente). Los tejidos de los animales expuestos a 900 MHz (G1), 2450 MHz (G2) y 900 + 2450 MHz simultáneamente (G3) fueron similares a las del grupo de control negativo no radiado (G4) en su apariencia y en la mínima prevalencia de signos de lesiones. En las fotomicrografías de las secciones de ratas expuestas a radiación gamma (G5), las flechas o asteriscos indican la presencia de dark neuronas en la corteza cerebral (e), glóbulos rojos en el músculo trapecioide (j), macrófagos activos que interactúan con otras células en el timo (o), y signos de destrucción en los conductos seminíferos (t). 100X (López-Furelos y col. 2012).





**Figura11.** Fotomicrografías en escala de grises de secciones teñidas con DAPI de la corteza cerebral (a)-(e), membrana de la mucosa lingual (f)-(j) y conductos seminíferos testiculares (k)-(o) de ratas de los grupos 1-5 (columnas G1-G5, respectivamente). Los tejidos de los animales expuestos a 900 MHz (G1), 2450 MHz (G2) y 900 + 2450 MHz simultáneamente (G3) tuvieron similar integridad nuclear a los del grupo de control negativo no radiado (G4). En las fotomicrografías de las secciones de ratas expuestas a gamma radiación (G5), las flechas indican dark neuronas típicas en estados preapoptóticos en la corteza cerebral (e), y células apoptóticas en el lingual mucosa (j) y los conductos seminíferos testiculares (o). 100x (López-Furelos y col. 2012).

#### 4.1.2.2. Tinción de los núcleos mediante DAPI

El examen de los tejidos teñidos con DAPI se realizó bajo un microscopio de fluorescencia a 100X mostrando las siguientes características de la morfología nuclear (Fig. 11):

En las secciones de la corteza cerebral, el cerebelo y la tiroides de animales de grupos 1-4, los signos de apoptosis (condensación de cromatina o fragmentación del ADN) fueron raros, apareciendo en menos del 3% de las células en el cerebelo del grupo 3. Los núcleos de las neuronas de los animales expuestos a radiación ionizante gamma (grupo 5) exhibieron agregación nuclear.

Las tasas de apoptosis en las secciones de tejido de lengua de los animales radiados con una sola frecuencia (grupos 1 y 2) fueron insignificantes y similares a las de los animales no expuestos del grupo 4. La apoptosis fue más frecuente en las secciones de lengua del grupo 3, pero nunca superó el 4% (se encontró en las células epiteliales de las mucosas). Los animales expuestos a radiación gamma mostraron tasas de apoptosis mucho mayores.

En los grupos 1-4 menos del 4% de las células del tejido graso interescapular eran apoptóticas, mientras que los efectos del grupo 5 eran mucho más altos.

El musculo trapecio, el timo y los testículos de los grupos 1-4 mostraron pocos o ningún signo de apoptosis. Por el contrario, la apoptosis era común en estos tejidos en los animales del control positivo o grupo 5, como se muestra por los núcleos deformados o fragmentados.

#### **4.2. RESULTADOS DEL EXPERIMENTO II: *EVIDENCIA DEL ESTRÉS CELULAR Y DE LA CASPASA-3 RESULTANTE DE UNA SEÑAL COMBINADA DE DOS FRECUENCIAS EN EL CEREBRO Y EL CEREBELO DE RATAS SPRAGUE-DAWLEY.***

La exposición de la población general a los campos de RF de los teléfonos móviles, redes inalámbricas, televisión, radiodifusión y otras tecnologías de comunicación se ha vuelto universal y continua en los últimos años. Los humanos también están expuestos simultáneamente a múltiples señales de RF y hay muy escasa información sobre los efectos biológicos de este hecho. Solo unos pocos estudios epidemiológicos (Thomas y col., 2008a; 2008b), *in vitro* (Kang y col., 2014) o *in vivo* (Lee y col., 2011; 2012) se han realizado teniendo en cuenta la exposición a RF combinadas. Todavía no está claro si hay



repercusiones en la salud humana. A pesar de que existe un consenso general de que la radiofrecuencia puede afectar en humanos al encefalograma y otros marcadores de la función cerebral (Jin y col., 2011), no hay datos suficientes para afirmar que la interacción de múltiples RF afecta la fisiología del tejido nervioso.

Los CEM pueden actuar como inductores de estrés celular y provocar la síntesis de proteínas citoprotectoras de choque térmico (HSP) (Jorge-Mora y col., 2010; Yang y col., 2012). El aumento de las proteínas HSP en los tejidos a menudo se asocia con una resistencia o disminución de la apoptosis (muerte celular programada) (Misa-Agustíño y col., 2012). La Hsp70 es una de las principales proteínas inducidas por estrés en el sistema nervioso y se ha demostrado su función neuroprotectora tanto *in vivo* como *in vitro* (Calabrò y col., 2012). Recientes estudios sugieren que la exposición a microondas puede inducir la apoptosis de las células nerviosas, ya que el aumento de caspasa-3 indica la activación preapoptótica de la vía mitocondrial dependiente de caspasa (Zuo y col., 2014). Los efectos biológicos descritos están relacionados con la duración, frecuencia e intensidad de los campos electromagnéticos (Campisi y col., 2010). Con la intención de seguir investigando posibles mecanismos de acción de las RF, expusimos ratas Sprague-Dawley a radiación en un sistema experimental de radiación multifrecuencia y calculamos el SAR combinado por FDTD. Luego analizamos los efectos del estrés celular estudiando Hsp90 y 70 junto con los efectos de la actividad preapoptótica de la caspasa-3 en los hemisferios izquierdo y derecho del cerebro y el cerebelo.

#### 4.2.1. Simulación de la señal y cálculo SAR

Cada una de las señales sinusoidales puras utilizadas en el Grupo I (900 MHz) y II (2450 MHz), y la suma de ambas señales (900 + 2450 MHz) se puede ver en la Figura 12A, que ilustra las simulaciones utilizando el software científico MATLAB. La combinación de señales obtenidas en la simulación también se validó en el laboratorio a bajas frecuencias utilizando el osciloscopio Agilent Infinium (600 MHz) para visualizar la señal de salida que resulta de la suma de las dos señales sinusoidales.

Las tablas 6 y 7 muestran cómo los valores de SAR, en los grupos del I al III de ratas radiadas en el cerebro, el cerebelo y el cuerpo

corresponden al valor SAR medio para cada tipo de tejido. Las Figuras 12B y 12C muestran la distribución media del SAR promedio en secciones verticales en el fantoma numérico de rata a 900 MHz (potencia = 1W o 2W) y 2450 MHz (potencia = 1 W o 2 W) y la combinación de ambas frecuencias (900 + 2450 MHz) y potencias (1 + 1/ 2 + 2).

#### **4.2.2. Efectos de estrés medidos mediante cambios en la temperatura rectal post-radiación.**

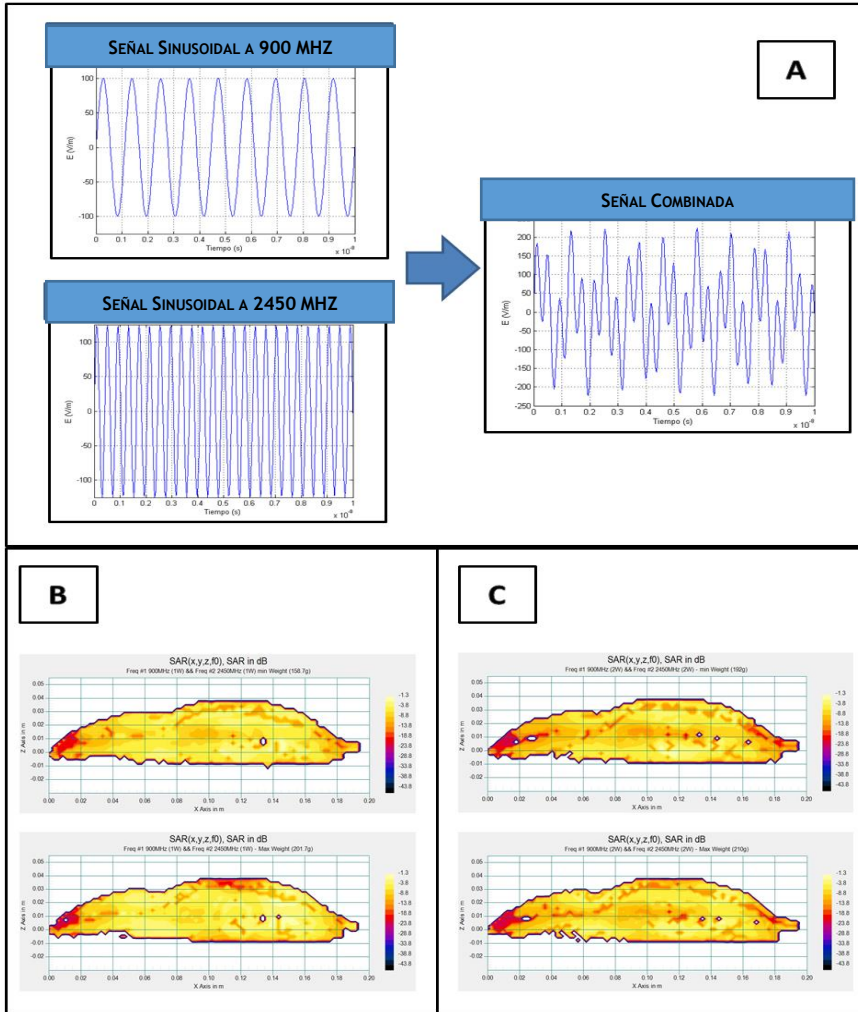
A una radiación de 2 vatios de potencia, la diferencia entre el valor promedio de las medias de una o varias RF fue estadísticamente significativa frecuencias ( $p = 0.029$ ) y mayor de lo esperado, excluyendo que esta diferencia sea debida al azar. No hubo diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0.433$ ) entre temperatura de antes y después de la radiación en ningún grupo expuesto. Los test de comparaciones múltiples (prueba t de Bonferroni) mostraron la existencia de diferencias significativas ( $p = 0.025$ ) después de la radiación entre el Grupo III (exposición multifrecuencia) y el Grupo IV (no radiados). Ver la Tabla 8.

Los animales expuestos a una radiación de 4 vatios de potencia no presentaron diferencias entre el valor promedio de las medias de una o varias RF, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $p = 0.359$ ) o fueron lo suficientemente grandes como para excluir la posibilidad de que estas diferencias fuesen causadas por el azar en la temperatura antes y después de la radiación.

	Peso (g)	SAR calculado mediante FDTD: medidas experimentales		
		Promedio de SAR en el cuerpo [W/kg]	Promedio de SAR en el cerebro [W/kg]	Promedio de SAR en el cerebelo [W/kg]
GRUPO I f=900MHz P <sub>TR</sub> =2W E <sub>m</sub> =48V/m P <sub>D</sub> =6.11W/m <sup>2</sup>	185.9	0.0541	0.0583	0.0212
	198.4	0.0510	0.0513	0.0320
GRUPO II f=2450MHz P <sub>TR</sub> =2W E <sub>m</sub> =50V/m P <sub>D</sub> =6.63W/m <sup>2</sup>	175.7	0.0723	0.2731	0.1590
	193.9	0.0682	0.2344	0.1094
GRUPO I f=900+2450MHz P <sub>TR</sub> =1W+1W E <sub>m</sub> =39 V/m P <sub>D</sub> =4.03W/m <sup>2</sup>	158.7	0.0478	0.0212	0.0678
	201.7	0.0367	0.0183	0.0422

	Peso (g)	SAR calculado mediante FDTD: medidas experimentales		
		Promedio de SAR en el [W/kg]	Promedio de SAR en el cerebro [W/kg]	Promedio de SAR en el cerebelo [W/kg]
GRUPO I f=900MHz P <sub>TR</sub> =4W E <sub>m</sub> =62 V/m P <sub>D</sub> =10.20W/m <sup>2</sup>	191.9	0.0870	0.0732	0.0452
	219.6	0.0829	0.0934	0.0822
GRUPO II f=2450MHz P <sub>TR</sub> =4W E <sub>m</sub> =57 V/m PD=8.62W/m <sup>2</sup>	186.7	0.0919	0.3274	0.1765
	207.3	0.0838	0.2572	0.1224
GRUPO I f=900+2450MHz P <sub>TR</sub> =2W+2W E <sub>m</sub> =53 V/m P <sub>D</sub> =7.45W/m <sup>2</sup>	192.0	0.0705	0.1590	0.0856
	210.0	0.0776	0.1622	0.0894

**Tablas 6 y 7.** Valores de SAR en cerebro, cerebelo y cuerpo del fantoma numérico de rata Sprague-Dawley, calculado a partir de la potencia transmitida (P<sub>TR</sub>), campo eléctrico (E<sub>m</sub>) y densidad de potencia incidente (PD) (López-Furelos y col. 2016).



**Figura 12.** A. Representación de cada una de las señales sinusoidales puras utilizadas en el Grupo I (900 MHz) y II (2450 MHz) y la suma de ambas señales (900 + 2450 MHz). B. Distribución de la media del SAR en secciones verticales del fantoma numérico cuando se radia simultáneamente con 900 MHz ( $P_{TR} = 1$  W) y 2450 MHz ( $P_{TR} = 1$  W) para los casos de masa mínima y máxima de los grupos. El SAR es expresado en relación con la absorción de toda la densidad de potencia local en ausencia de la rata. C. Distribución de la media de SAR en secciones verticales del fantoma numérico de rata cuando se radia simultáneamente con 900 MHz ( $P_{TR} = 2$  W) y 2450 MHz ( $P_{TR} = 2$  W) para los casos de masa mínima y máxima de los grupos. El SAR se expresa en relación con la absorción de toda la densidad de potencia local en ausencia de la rata (López-Furelos y col. 2016).

	Temperaturas rectales en ratas expuestas a 2W	
Grupos experimentales	Antes de la radiación	Después de la radiación
Grupo I	$37.560 \pm 18 \times 10^{-2}$	$36.698 \pm 4 \times 10^{-1}$
Grupo II	$37.125 \pm 15 \times 10^{-2}$	$37.012 \pm 16 \times 10^{-2}$
Grupo III	$37.427 \pm 9 \times 10^{-2}$	$37.493 \pm 2 \times 10^{-1*}$
Grupo IV	$37.070 \pm 19 \times 10^{-2}$	$36.935 \pm 10 \times 10^{-2}$

**Tabla 8.** Media de las temperaturas rectales  $\pm$ DEM antes y después de radiar a 2 W de potencia

\*Diferencias estadísticamente significativas entre grupos expuestos a una o más frecuencias simultaneas.

\*Diferencias significativas después de la radiación en comparación con el control no radiado (GIV) (López-Furelos y col. 2016).

	Temperaturas rectales en ratas expuestas a 4W	
Grupos experimentales	Antes de la radiación	Después de la radiación
Grupo I	$37.493 \pm 2.7 \times 10^{-1}$	$36.580 \pm 3.9 \times 10^{-1\#}$
Grupo II	$37.267 \pm 2.3 \times 10^{-1}$	$36.400 \pm 2 \times 10^{-1* \#}$
Grupo III	$37.610 \pm 1.5 \times 10^{-1}$	$36.447 \pm 4 \times 10^{-2}$
Grupo IV	$37.290 \pm 5.7 \times 10^{-1}$	$36.923 \pm 5 \times 10^{-1}$

**Tabla 9.** Media de las temperaturas rectales  $\pm$ DEM antes y después de radiar a 4 W de potencia.

\*Diferencias estadísticamente significativas entre grupos expuestos a una o más frecuencias simultaneas.

#Diferencias significativas entre antes y después de la radiación.

\*Diferencias significativas después de la radiación en comparación con el control no radiado (GIV) (López-Furelos y col. 2016).

	Lado	Em [V/m]	Media de SAR del cerebelo [W/kg]	Media de SAR del cerebro [W/kg]
GRUPO I f = 900 MHz P <sub>TR</sub> = 2 W	Izq.	50.6 3	0.0556236	0.0410845
	Der.	50.0 6	0.0402864	0.0250631
GRUPO II f = 2450 MHz P <sub>TR</sub> = 2 W	Izq.	53.3 2	0.0492298	0.0907025
	Der.	41.3 0	0.0260181	0.0858929
GRUPO I f = 900 + 2450 MHz P <sub>TR</sub> = 1 + 1 W	Izq.	43.2 7	0.03361385	0.05669851
	Der.	39.6 0	0.0266726	0.03580835

	Lado	Em [V/m]	Media de SAR del cerebelo [W/kg]	Media de SAR del cerebro [W/kg]
GRUPO I f = 900 MHz P <sub>TR</sub> = 4 W	Izq.	71.4 2	0.1119	0.0818
	Der.	70.9 9	0.0802	0.0504
GRUPO II f = 2450 MHz P <sub>TR</sub> = 4 W	Izq.	74.6 7	0.0965	0.1832
	Der.	58.6 9	0.0596	0.1666
GRUPO I f = 900 + 2450 MHz P <sub>TR</sub> = 2 + 2 W	Izq.	57.4 2	0.0628	0.1086
	Der.	55.5 8	0.0495	0.0647

**Tablas 10 y 11.** valores de SAR en cerebro, cerebelo y cuerpo del fantoma numérico de rata Sprague-Dawley, calculado a partir de la potencia (P<sub>TR</sub>), campo eléctrico (Em) en ambos lados del cerebro (izquierda y derecha) (López-Furelos y col. 2016).

### 4.2.3. Resultados de los inmunoensayos ELISA.

#### 4.2.3.1. En la corteza cerebral.

Hsp90: La diferencia entre el valor promedio de las medias en los niveles de proteína Hsp90 en los hemisferios izquierdo y derecho de la corteza cerebral después de la exposición a radiación de 2 vatios fue estadísticamente significativa ( $p = 0.011$ ) y mayor de lo que cabría esperar por azar. Se utilizó un test de comparaciones múltiples (prueba t de Bonferroni) para analizar las diferencias entre grupos.

En los animales expuestos a radiación de 2 vatios de potencia, la diferencia entre el valor promedio de las medias de los niveles de proteína Hsp90 en cada uno de los diferentes grupos de RF no fue estadísticamente significativa ( $p = 0.38$ ) o lo suficientemente grande como para excluir la posibilidad de que sea debida al azar después de tener en cuenta los resultados de cada uno de los hemisferios de la corteza cerebral.

Los efectos sobre los niveles de proteína Hsp90 observados en los hemisferios cerebrales de los animales radiados a 2 vatios, no dependieron de si se expusieron a una o dos RF. No hubo una interacción estadísticamente significativa entre los hemisferios de la corteza cerebral y la RF ( $p = 0.75$ ) (Figura 13A).

La diferencia entre el valor promedio de las medias de la expresión de la proteína Hsp90 obtenidas de ambos hemisferios cerebrales expuestos a una radiación de 4 vatios de potencia fue estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ) y mayor de lo que cabría esperar, excluyendo la posibilidad de que la diferencia sea debido a valores al azar después de tener en cuenta los resultados de cada una de las diferentes radiofrecuencias. Se utilizó un test de comparaciones múltiples (prueba t de Bonferroni) para analizar las diferencias entre grupos.

Se detectaron diferencias significativas en los valores de la proteína Hsp90 entre los hemisferios cerebrales derecho e izquierdo en los Grupos I ( $p < 0.001$ ), II ( $p = 0.041$ ) y III ( $p = 0.042$ ), pero no en el Grupo IV ( $p = 0.625$ ) (Ver la Figura 13B).

La diferencia entre el valor promedio de las medias de los niveles de proteína Hsp90 de cada uno de los diferentes grupos de RF en los animales expuestos a una radiación de 4 vatios de potencia no fue estadísticamente significativa ( $p = 0.663$ ) o lo suficientemente grande como para excluir la posibilidad de que sea debida al azar después de

tener en cuenta los resultados obtenidos de ambos hemisferios de la corteza cerebral.

Los efectos sobre la expresión de la proteína Hsp90 observados en los hemisferios cerebrales de los animales radiados a 4 vatios no dependieron de si se expusieron a una o dos RF. No hubo una interacción estadísticamente significativa entre los hemisferios de la corteza cerebral y la RF ( $p = 0.211$ ).

**Hsp70:** La diferencia entre el valor promedio de las medias de expresión de la proteína Hsp70 en cada hemisferio cerebral después de la exposición a una radiación de 2 vatios de potencia, no fue estadísticamente significativa ( $p = 0.545$ ) o lo suficientemente grande como para excluir la posibilidad de que esta diferencia sea debida al azar, después de tener en cuenta los resultados de cada una de las diferentes radiofrecuencias.

La diferencia entre el valor promedio de las medias en los niveles de Hsp70 de cada uno de los diferentes grupos de RF en los animales expuestos a radiación de 2 vatios de potencia, no fue estadísticamente significativa ( $p = 0.911$ ) o lo suficientemente grande como para excluir la posibilidad de que sea debida al azar después de tener en cuenta los resultados de cada uno de los hemisferios de la corteza cerebral.

Los efectos de la proteína Hsp70 observados en cada hemisferio cerebral de los animales radiados a 2 vatios no dependieron de si se expusieron a una o dos RF. No hubo una interacción estadísticamente significativa entre los hemisferios de la corteza cerebral y la RF ( $p = 0.771$ ) (Figura 13).

La diferencia entre el valor promedio de las medias en los niveles de Hsp70 de cada uno de los hemisferios de la corteza cerebral después de la exposición a radiación de 4 vatios de potencia fue estadísticamente significativa ( $p = 0.003$ ) y mayor de lo que cabría esperar por azar, excluyendo la posibilidad de que la diferencia sea debido a valores al azar después de tener en cuenta los resultados de los diferentes grupos de radiofrecuencias. Se utilizó un test de comparaciones múltiples (prueba t de Bonferroni) para analizar las diferencias entre grupos. Los valores de Hsp70 fueron significativamente más altos en el hemisferio izquierdo en los Grupos I ( $p < 0.003$ ) y II ( $p = 0.003$ ), pero no en los Grupos III ( $p = 0.162$ ) o IV ( $p = 0.217$ ).

La diferencia entre el valor promedio de las medias en los niveles de Hsp70 de cada uno de los diferentes grupos de RF de los animales



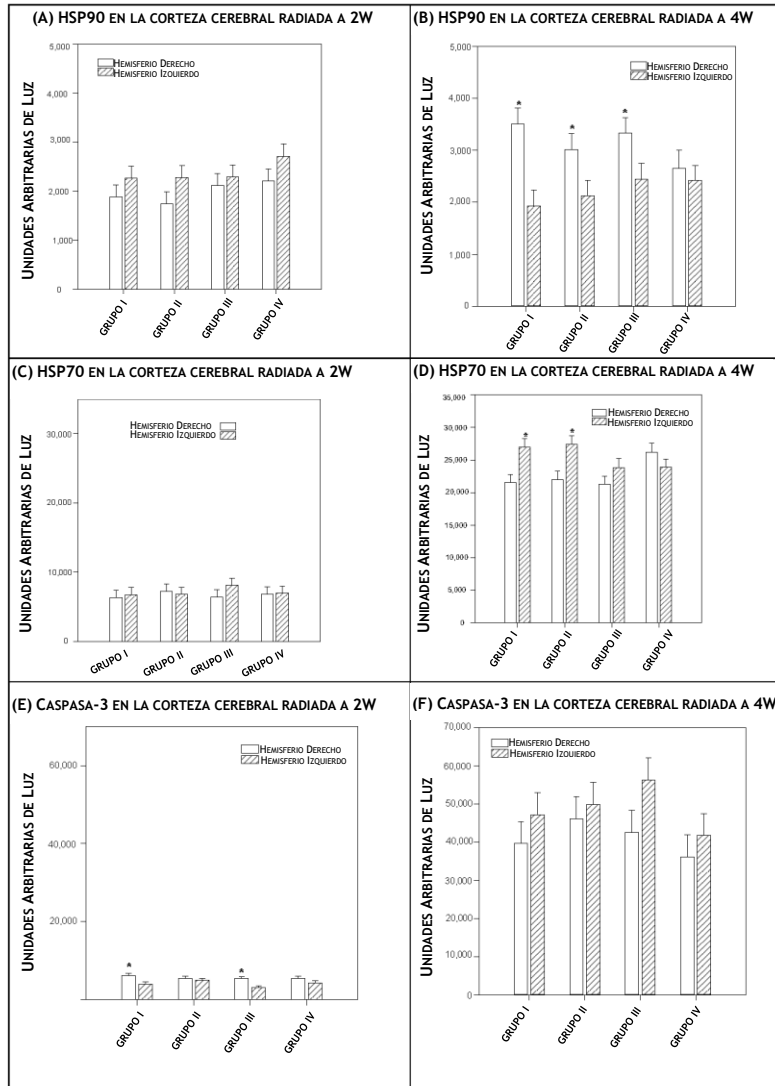
expuestos a radiación de 4 vatios de potencia no fue estadísticamente significativa ( $p = 0.239$ ) o lo suficientemente grande como para excluir la posibilidad de que sea debida al azar después de tener en cuenta los resultados de cada uno de los hemisferios de la corteza cerebral.

Los efectos de Hsp70 observados en los hemisferios cerebrales de los animales radiados a 4 vatios dependieron de si se expusieron a una o dos RF. Hubo una interacción estadísticamente significativa entre el factor hemisferio de la corteza cerebral y la RF, una o varias ( $p = 0.010$ ).

Caspasa-3 (CASP3): La diferencia entre el valor promedio de las medias de los niveles de CASP3 cada uno de los hemisferios cerebrales después de la exposición a la radiación de 2 vatios, fue estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ) y mayor de lo que cabría esperar por azar, excluyendo la posibilidad de que la diferencia sea debida al azar después de tener en cuenta los resultados de cada una de las diferentes radiofrecuencias. Se utilizó un test de comparaciones múltiples (prueba t de Bonferroni) para analizar las diferencias entre grupos. Se detectaron diferencias significativas entre los valores de CASP3 de los hemisferios derecho e izquierdo en los Grupos I ( $p < 0.006$ ) y III ( $p = 0.003$ ), pero no en los Grupos II ( $p = 0.578$ ) y IV ( $p = 0.140$ ) (Figura 13).

La diferencia entre el valor promedio de las medias de los niveles de CASP3 cada uno de los diferentes grupos de RF en los animales expuestos a radiación de 2 vatios de potencia, no fue estadísticamente significativa ( $p = 0.320$ ) o lo suficientemente grande como para excluir la posibilidad de que sea debida al azar después de tener en cuenta los resultados de cada uno de los hemisferios de la corteza cerebral.

Los efectos sobre la CASP3 observados en cada uno de los hemisferios cerebrales de los animales radiados a 2 vatios no dependieron de si se expusieron a una o dos RF. No hubo una interacción estadísticamente significativa entre los factores hemisferios de la corteza cerebral y la RF (una o varias) ( $p = 0.306$ ).



**Figura 13.** Los histogramas representan las medias y las desviaciones estándar de los valores de quimioluminiscencia para (A, B) Hsp90, (C, D) Hsp70 y (E, F) caspasa-3 en ratas radiadas a 2W o 4W, en los hemisferios derecho e izquierdo del cerebro corteza para cada grupo: GI (900 MHz), GII (2450 MHz), GIII (900 + 2450 MHz) y GIV (control). \* indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los hemisferios derecho e izquierdo (López-Furelos y col. 2016).

La diferencia entre el valor promedio de las medias de los niveles de CASP3 en cada uno de los hemisferios cerebrales después de la exposición a radiación de 4 vatios, no fue estadísticamente significativa ( $p = 0.063$ ) o lo suficientemente grande como para excluir la posibilidad de las diferencias sean debidas al azar después de tener en cuenta los resultados de las diferencias entre cada una de las radiofrecuencias.

La diferencia entre el valor promedio de las medias en los niveles de CASP3 de cada uno de los diferentes grupos de RF en los animales expuestos a radiación de 4 vatios de potencia no fue estadísticamente significativa ( $p = 0.259$ ) o lo suficientemente grande como para excluir la posibilidad de que sea debido valores aleatorios después de tener en cuenta los resultados de cada uno de los hemisferios de la corteza cerebral.

Los efectos de la proteína CASP3 observados en cada uno de los hemisferios cerebrales de los animales radiados a 4 vatios no dependieron de si se expusieron a una o dos RF. No hubo una interacción estadísticamente significativa entre los hemisferios de la corteza cerebral y la RF ( $p = 0.837$ ) (Figura 13F).

#### 4.2.3.2. En el cerebelo.

**Hsp90:** La diferencia entre el valor promedio de las medias de los niveles de Hsp90 en cada uno de los hemisferios del cerebelo después de la exposición a una radiación 2 vatios, no fue estadísticamente significativa ( $p = 0.691$ ) o lo suficientemente grande como para excluir la posibilidad de que esta diferencia sea debida al azar después de tener en cuenta los resultados de las diferencias entre las radiofrecuencias.

La diferencia entre el valor promedio de las medias de expresión de la Hsp90 en cada uno de los diferentes grupos de RF en los animales expuestos a radiación de 2 vatios de potencia, no fue estadísticamente significativa ( $p = 0.543$ ) o lo suficientemente grande como para excluir la posibilidad de que sea debida al azar después de tener en cuenta los resultados de cada uno de los hemisferios cerebelosos.

Los efectos de la proteína Hsp90 observados en cada uno de los hemisferios cerebrales de los animales radiados a 2 vatios, no dependieron de si se expusieron a una o dos RF. No hubo una interacción estadísticamente significativa entre los hemisferios cerebelosos y la RF ( $p = 0.713$ ) (Figura 14A).

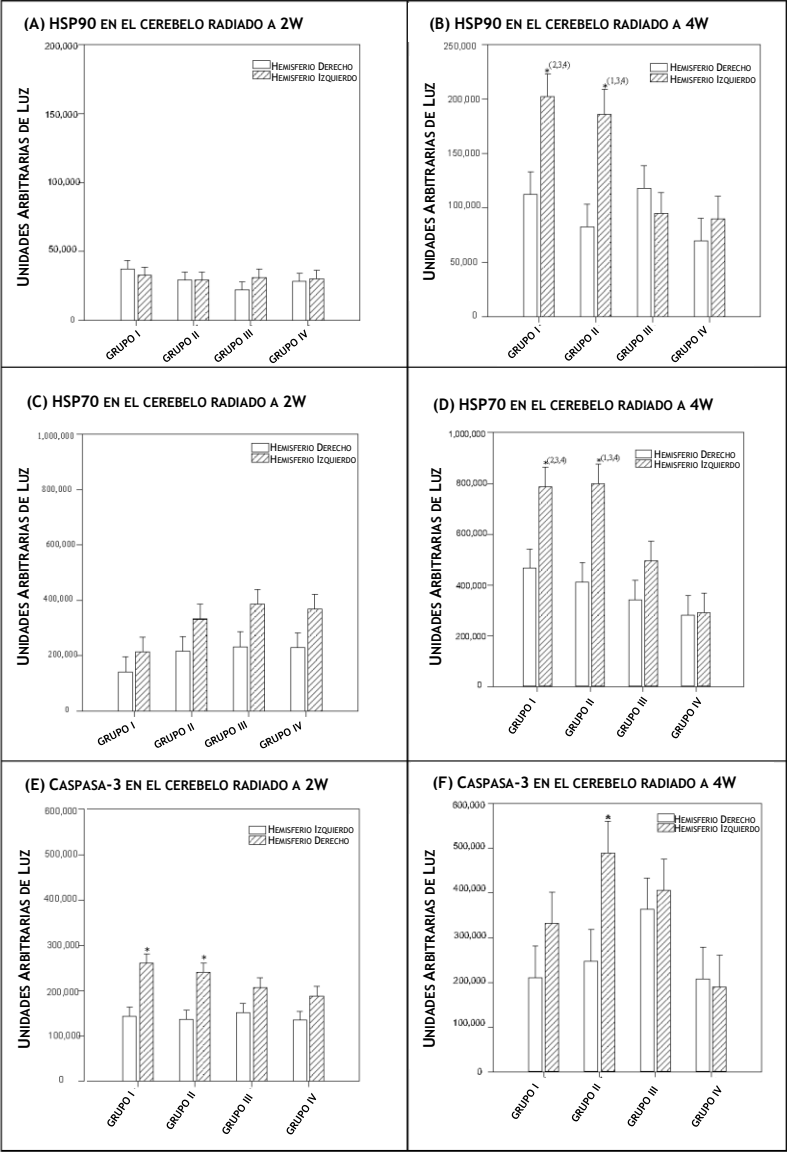
La diferencia entre el valor promedio de las medias de expresión de la proteína Hsp90 en cada uno de los hemisferios del cerebelo después de la exposición a radiación con 4 vatios, fue estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ) y mayor de lo que cabría esperar por azar, excluyendo la posibilidad de que la diferencia sea debida a valores aleatorios después de tener en cuenta los resultados de cada una de las diferentes radiofrecuencias.

Los niveles de la proteína Hsp90 fueron significativamente mayores en el hemisferio cerebeloso izquierdo en el Grupo I ( $p = 0.003$ ) y en el Grupo II ( $p < 0.001$ ).

La diferencia entre el valor promedio de las medias de los niveles de Hsp90 cada uno de cada uno de los diferentes grupos de RF en los animales expuestos a radiación de 4 vatios de potencia, fue estadísticamente significativa ( $p = 0.002$ ) y mayor de lo que cabría esperar por azar, excluyendo la posibilidad de que la diferencia sea debida a valores aleatorios después de tener en cuenta los resultados de cada uno de los hemisferios cerebelosos.

Se utilizó un test de comparaciones múltiples (prueba t de Bonferroni) para analizar las diferencias entre grupos. Los hemisferios cerebelosos derechos de animales que recibieron diferentes tipos de radiación no presentaron diferencias significativas en la expresión de la proteína. Sin embargo, aparecieron diferencias significativas en los efectos sobre los niveles de expresión de la proteína del hemisferio cerebeloso izquierdo entre el Grupo I (900 MHz) y los Grupos III (900 + 2450 MHz) o IV (sin radiación) ( $p = 0.001$  y  $p = 0.005$ ). También hubo diferencias entre el Grupo II y los Grupos III y IV ( $p = 0.021$  y  $p = 0.05$ ) (Figura 14B).

Los efectos sobre la expresión de la proteína Hsp90 observados en los hemisferios cerebelosos de los animales radiados a 4 vatios dependieron de si se expusieron a una o dos RF. Hubo una interacción estadísticamente significativa entre los hemisferios de la corteza cerebral y la RF ( $p = 0.012$ ).



**Figura 14.** Los histogramas representan las medias y las desviaciones estándar de los valores de quimioluminiscencia para (A, B) Hsp90, (C, D) Hsp70 y (E, F) caspasa-3 en ratas radiadas a 2W o 4W, en los hemisferios derecho e izquierdo del cerebro corteza para cada grupo: GI (900 MHz), GII (2450 MHz), GIII (900 + 2450 MHz) y GIV (control). \* indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los hemisferios derecho e izquierdo (López-Furelos y col. 2016).

Hsp70: La diferencia entre el valor promedio de las medias de los niveles de Hsp70 en cada uno de los hemisferios del cerebelo después de la exposición a radiación de 2 vatios, fue estadísticamente significativa ( $p = 0.009$ ) y mayor de lo que cabría esperar por azar, excluyendo la posibilidad de que la diferencia sea debida a valores aleatorios después de tener en cuenta los resultados de las diferentes radiofrecuencias. Se utilizó un test de comparaciones múltiples (prueba t de Bonferroni) para analizar las diferencias entre grupos.

La diferencia entre el valor promedio de las medias de la expresión de la proteína Hsp70 en cada uno de los diferentes grupos de RF en los animales expuestos a radiación de 2 vatios de potencia fue estadísticamente significativa ( $p = 0.03$ ) y mayor de lo que cabría esperar por azar, excluyendo la posibilidad de que la diferencia sea debida a valores aleatorios después de tener en cuenta los resultados de cada uno de los hemisferios del cerebelo. Usamos un test de comparaciones múltiples para analizar las diferencias entre grupos.

Los efectos de la proteína Hsp70 observados en cada uno de los hemisferios cerebelosos de los animales radiados a 2 vatios no dependieron de si se expusieron a una o dos RF. No hubo una interacción estadísticamente significativa entre los hemisferios del cerebelo y la RF ( $p = 0.984$ ) (Figura 14C).

La diferencia entre el valor promedio de las medias de expresión de la proteína Hsp70 cada uno de los hemisferios del cerebelo después de la exposición a radiación de 4 vatios, fue estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ) y mayor de lo que cabría esperar por azar, excluyendo la posibilidad de que la diferencia sea debida a valores aleatorios después de tener en cuenta los resultados de cada una de las diferentes radiofrecuencias. Se utilizó un test de comparaciones múltiples (prueba t de Bonferroni) para analizar las diferencias entre grupos. Los efectos de Hsp70 fueron significativamente mayores en el hemisferio izquierdo del cerebelo en el Grupo I ( $p = 0.004$ ) y el Grupo II ( $p < 0.001$ ) (Figura 14D).

La diferencia entre el valor promedio de las medias de los niveles de la proteína Hsp70 cada uno de los diferentes grupos de RF en los animales expuestos a radiación de 4 vatios de potencia, fue estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ) y mayor de lo que cabría esperar por azar, excluyendo la posibilidad de que la diferencia sea debida a valores aleatorios después de tener en cuenta los resultados de

cada uno de los hemisferios del cerebelo. Se utilizó un test de comparaciones múltiples (prueba t de Bonferroni) para analizar las diferencias entre grupos.

Los efectos de Hsp70 del hemisferio izquierdo de los Grupos I y II, que se expusieron a una sola frecuencia de 900 y 2450 MHz, respectivamente, fueron significativamente más altos que los de los animales expuestos a las dos radiofrecuencias ( $p = 0.049$  y  $p = 0.035$ ) y los de los animales no radiados del Grupo IV ( $p < 0.001$  en ambos casos) (Figura 14D).

Los efectos de la proteína Hsp70 observados en cada uno de los hemisferios cerebelosos de los animales radiados a 4 vatios no dependieron de si se expusieron a una o dos RF. No hubo una interacción estadísticamente significativa entre los hemisferios cerebelosos y la RF ( $p = 0.064$ ).

**Caspasa-3:** La diferencia entre el valor promedio de las medias de la expresión CASP3 en cada uno de los hemisferios del cerebelo de los animales después de la exposición a radiación de 2 vatios de potencia, fue estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ) y mayor de lo que cabría esperar por azar, excluyendo la posibilidad de que la diferencia sea debida a valores aleatorios después de tener en cuenta los resultados de cada una de las diferentes radiofrecuencias. Se utilizó un test de comparaciones múltiples (prueba t de Bonferroni) para analizar las diferencias entre grupos. La caspasa-3 fue significativamente más alta en el hemisferio cerebeloso izquierdo de los animales en los Grupos I y II ( $p < 0.001$  en ambos casos).

La diferencia entre el valor promedio de las medias de expresión de la CASP3 en cada uno de los diferentes grupos de RF en los animales expuestos a radiación de 2 vatios de potencia, no fue estadísticamente significativa ( $p = 0.241$ ) o lo suficientemente grande como para excluir la posibilidad de que sea debido al azar después de tener en cuenta los resultados de cada uno de los hemisferios del cerebelo.

Los efectos sobre la expresión de la proteína CASP3 observados en cada uno de los hemisferios cerebelosos de los animales radiados a 2 vatios, no dependieron de si se expusieron a una o dos RF. No hubo una interacción estadísticamente significativa entre los hemisferios de la corteza cerebral y la RF ( $p = 0.271$ ) (Figura 14E).

La diferencia entre el valor promedio de las medias de los niveles de CASP3 en cada uno de los hemisferios del cerebelo de los animales

después de la exposición a de 4 vatios de potencia, no fue estadísticamente significativa ( $p = 0.054$ ) o lo suficientemente grande como para excluir la posibilidad de las diferencias sean debidas al azar después de tener en cuenta los resultados de las diferencias entre las radiofrecuencias. La expresión de la CASP3 fue significativamente mayor en el hemisferio cerebeloso izquierdo de los animales del Grupo II ( $p = 0.016$ ), pero no en los otros grupos.

La diferencia entre el valor promedio de las medias de expresión de la CASP3 en cada uno de los diferentes grupos de RF en los animales expuestos a radiación de 4 vatios de potencia fue estadísticamente significativa ( $p = 0.030$ ) y mayor de lo que cabría esperar por azar, excluyendo la posibilidad de que la diferencia sea debida a valores aleatorios después de tener en cuenta los resultados de cada uno de los hemisferios del cerebelo. Se utilizó un test de comparaciones múltiples (prueba t de Bonferroni) para analizar las diferencias entre grupos.

Los valores de CASP3 en el hemisferio cerebeloso izquierdo de los animales del Grupo II, que se expusieron a 2450 MHz, fueron significativamente más altos que en los animales del grupo IV no radiados ( $p = 0.018$ ) (Figura 14F).

Los efectos sobre la expresión de la proteína CASP3 observados en los hemisferios cerebelosos de los animales radiados a 4 vatios no dependieron de si se expusieron a una o dos RF. No hubo una interacción estadísticamente significativa entre los hemisferios del cerebelo y la RF ( $p = 0.290$ ).

#### **4.3. RESULTADOS DEL EXPERIMENTO III: *LA EXPOSICIÓN A LA RADIACIÓN DE RADIO-FRECUENCIAS SIMPLES O COMBINADAS PROVOCA LA DISFUNCIÓN DE LOS MACRÓFAGOS EN LA LÍNEA CELULAR RAW 264.7.***

Para comparar las respuestas inmunes de los macrófagos, aplicamos una o más frecuencias a la línea celular de macrófagos RAW 264.7 durante 4, 24, 48 o 72 h en una cámara GTEM. Posteriormente se realizaron estudios para evaluar las funciones inmunes de los macrófagos, específicamente: la viabilidad celular, el estrés oxidativo mediante la cuantificación de la producción de óxido nítrico, la función citoprotectora y la función inflamatoria usando Hsp70 y TNF- $\alpha$ , y la actividad fagocítica de los macrófagos.



#### **4.3.1. Estudio del efecto de las RF sobre la viabilidad y la curva de crecimiento celular.**

La viabilidad y el crecimiento celular de los grupos radiados se midieron mediante citometría de flujo, usando 6 muestras por grupo / tiempo. Los resultados mostraron que la viabilidad de la línea celular RAW 264.7 no se vio afectada en los grupos radiados I (900 MHz), II (2450 MHz) o III (900 + 2450 MHz). No hubo diferencias significativas entre los grupos expuestos a la radiación (I, II, III) y el grupo no radiado (IV). De similar forma, no hubo diferencias significativas en la viabilidad celular como resultado de los diferentes tiempos de exposición a la radiación (Figura. 15, 16, 17, Secciones A y C).

En cuanto al crecimiento, no hubo diferencias significativas en las pendientes de la curva de crecimiento de 4 a 72 h para los grupos expuestos a la radiación (I, II, III) en relación con el grupo no radiado (IV). (Figura 15, 16, 17, Sección B)

#### **4.3.2 Efecto sobre la producción de óxido nítrico.**

La diferencia entre el valor promedio de las medias (7 muestras por grupo / tiempo) de los grupos (GI, GII, GIII, GIV) fue estadísticamente significativa ( $p \leq 0.001$ ) y mayor de lo que cabría esperar por azar, después de tener en cuenta los resultados diferentes en los tiempos de exposición. Utilizamos un test de comparaciones múltiples para analizar las diferencias entre los grupos. La diferencia entre el valor promedio de las medias de los diferentes tiempos de exposición (4, 24, 48 y 72 h) fue estadísticamente significativa ( $p = 0.023$ ) y mayor de lo que cabría esperar por azar, después de tener en cuenta los resultados diferentes en los grupos. Usamos un test de comparaciones múltiples para analizar las diferencias entre los grupos.

El efecto de la exposición a RF única o combinada no dependió del tiempo de exposición. No hubo interacción estadísticamente significativa entre la exposición a una o dos RF y el tiempo de exposición ( $p = 0.074$ ).

48 h después de la exposición a la radiación, los cultivos RAW 264.7 mostraron un aumento significativo en los valores de óxido nítrico en el Grupo II (2450 MHz) en comparación con el Grupo IV no radiado ( $p = 0.013$ ). También se encontraron efectos significativamente más bajos de óxido nítrico en el Grupo III en comparación con el Grupo I ( $p = 0.010$ ) y el Grupo II ( $p = 0.009$ ).

Se observó un aumento significativo en los valores de óxido nítrico en cultivos de macrófagos sometidos a radiación combinada en el Grupo III (900 + 2450 MHz) cuando el tiempo de exposición aumentó de 48 a 72 h ( $p = 0.050$ ) (Figura 18).

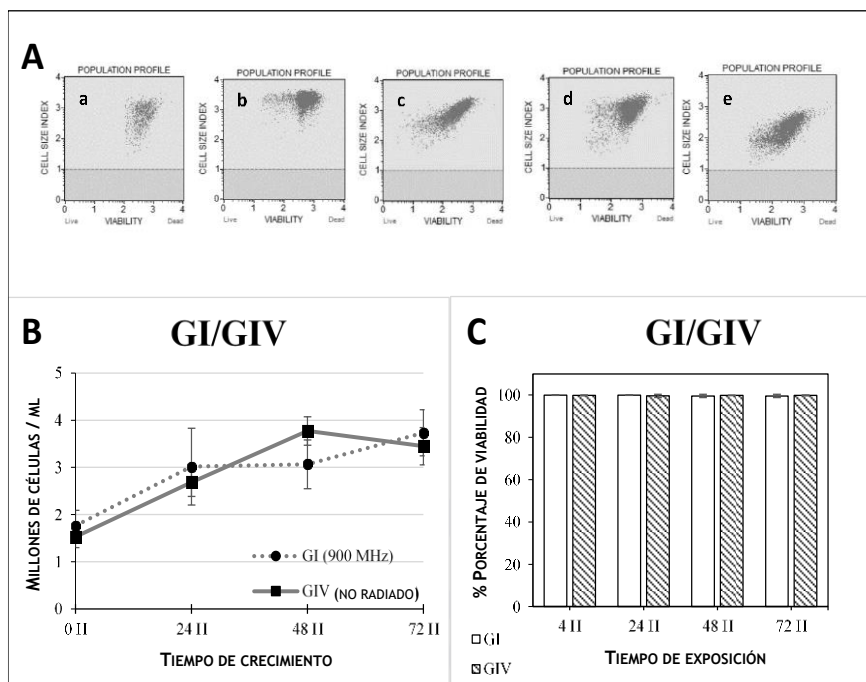
### **4.3.3 Análisis del efecto de las RF sobre expresión de los genes proinflamatorios Hsp70 y TNF- $\alpha$**

#### **4.3.3.1 Hsp70.**

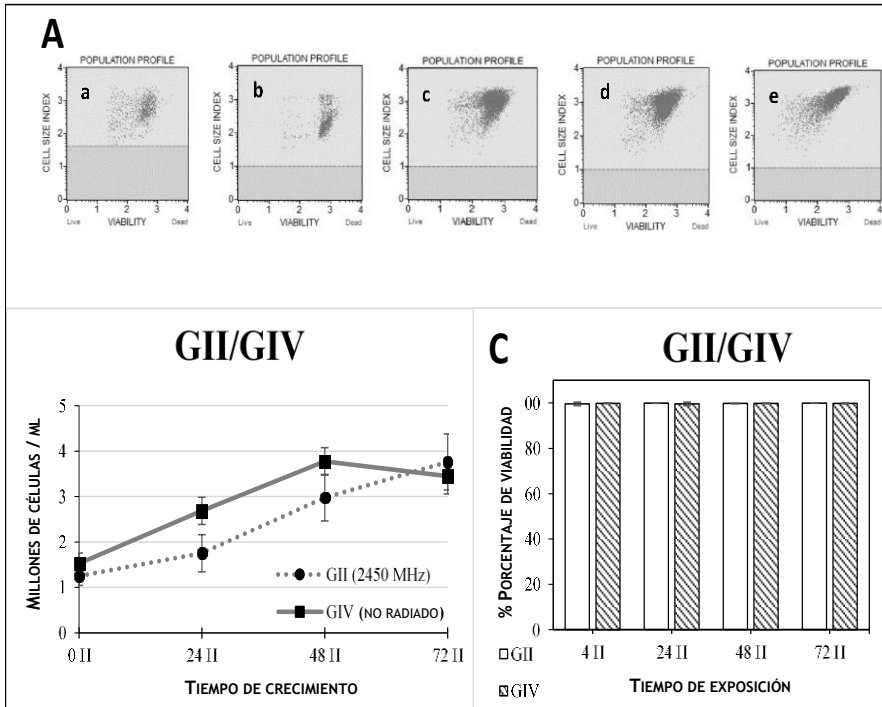
La diferencia entre el valor promedio de las medias en la expresión del gen Hsp70 de los grupos (GI, GII, GIII y GIV) no fue estadísticamente significativo ( $p = 0.588$ ) o lo suficientemente grande como para excluir la posibilidad de que la diferencia se debiera a valores aleatorios después de tener en cuenta los resultados en los diferentes tiempos de exposición.

La diferencia entre el valor promedio de las medias de expresión del gen Hsp70 a diferentes tiempos de exposición (4, 24, 48 y 72 h) fue estadísticamente significativa ( $p \leq 0.001$ ) y mayor de lo que cabría esperar por azar, después de tener en cuenta los diferentes efectos de los grupos expuestos a una o dos RF. Utilizamos un test de comparaciones múltiples para analizar las diferencias entre los grupos.

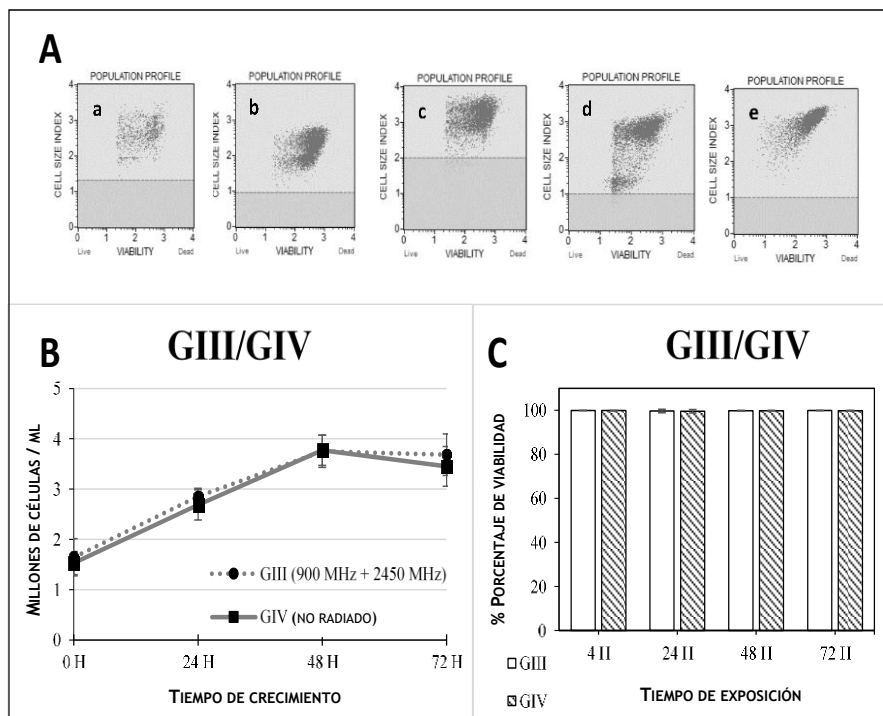
El efecto de las diferentes frecuencias de radiación sobre la expresión del gen Hsp70 no dependió del tiempo de exposición. No hubo interacción estadísticamente significativa entre los grupos y el tiempo de exposición ( $p = 0.605$ ).



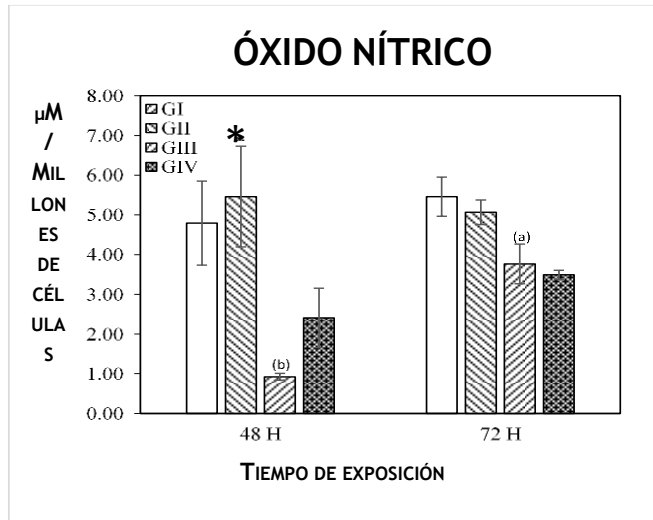
**Figura 15.** A. Diagramas de citometría de flujo del Grupo I (900 MHz) a las 4 h (a) 24 h (b) 48 h (c) y 72 h (d) en comparación con el grupo no radiado (e). B. El gráfico representa la evolución de las curvas de crecimiento del Grupo I (900 MHz) y del Grupo IV (no radiado) en el tiempo (de 4 a 72 h). C. Histograma del porcentaje de viabilidad de la línea celular RAW 264.7 radiada a 900 MHz (GI) a las 4 h, 24 horas, 48 h y 72 h en comparación con el grupo no radiado (GIV). Se usaron 6 muestras por grupo / tiempo.



**Figura 16.** A. Diagramas de citometría de flujo del Grupo II (2450 MHz) a las 4 h (a) 24 h (b) 48 h (c) y 72 h (d) en comparación con el grupo no radiado (e). B. El gráfico representa la evolución de las curvas de crecimiento del Grupo II (2450 MHz) y del Grupo IV (no radiado) en el tiempo (de 4 a 72 h). C. Histograma del porcentaje de viabilidad de la línea celular RAW 264.7 radiada a 2450 MHz (GII) a las 4 h, 24 h, 48 h y 72 h en comparación con el grupo no radiado (GIV). Se usaron 6 muestras por grupo / tiempo.



**Figura 17.** A. Diagramas de citometría de flujo del Grupo III (900 + 2450 MHz) a las 4 h (a) 24 h (b) 48 h (c) y 72 h (d) en comparación con el grupo no radiado (e). B. El gráfico representa la evolución de las curvas de crecimiento del Grupo III (900 + 2450 MHz) y del Grupo IV (no radiado) en el tiempo (de 4 a 72 h). C. Histograma del porcentaje de viabilidad de la línea celular RAW 264.7 radiada a 900 + 2450 MHz (GIII) a las 4 h, 24 h, 48 h y 72 h en comparación con el grupo no radiado (GIV). Se usaron 6 muestras por grupo / tiempo.



**Figura 18.** Los histogramas muestran la concentración de óxido nítrico en relación al tiempo en los grupos GI (900 MHz), GII (2450 MHz), GIII (900 + 2450 MHz) y GIV (no radiado). Los valores muestran las medias (7 muestras para cada grupo / tiempo) de los grupos radiados (GI, GII y GIII) y el grupo no radiado (GIV). Las barras de error indican el error estándar de la media (SEM) dentro de cada grupo (radiado o no radiado) (López-Furelos y col. 2018).

\* Indica diferencias significativas en relación al grupo no radiado ( $p < 0.05$ ).

<sup>a,b</sup> Indica diferencias significativas para cada grupo radiado en relación con el tiempo: 48 h (a), 72 h (b) ( $p < 0.05$ ).

La acción citoprotectora de la Hsp70 aumentó temporalmente después de 48 h de la radiación combinada en el Grupo III (900 + 2450 MHz), en comparación con los grupos radiados durante 24 h ( $p = 0.010$ ) y 4 h ( $p = 0.009$ ). La expresión de la Hsp70 también aumentó en el Grupo I (900 MHz) después de 48 h de exposición, con respecto a las células radiadas durante 4 h ( $p = 0.009$ ). (Figura 19A).

#### 4.3.3.2. TNF- $\alpha$ .

La diferencia entre el valor promedio de las medias en la expresión del gen proinflamatorio TNF- $\alpha$  de los grupos (GI, GII, GIII y GIV) no fue estadísticamente significativa ( $p = 0.612$ ) o lo suficientemente grande como para excluir la posibilidad de que la diferencia se debiera a valores aleatorios después de tener en cuenta los diferentes efectos en los tiempos de exposición.

La diferencia entre el valor promedio de las medias de expresión del TNF- $\alpha$  a los diferentes tiempos de exposición estudiados (4, 24, 48 y 72 h) no fue estadísticamente significativo ( $p = 0.471$ ) o lo suficientemente grande como para excluir la posibilidad de que la diferencia se debiera a valores aleatorios después de tener en cuenta los diferentes resultados en los grupos.

Los resultados de las diferentes frecuencias de radiación sobre la expresión de la citocina TNF- $\alpha$  no dependieron del tiempo de exposición. No hubo interacción estadísticamente significativa entre los grupos expuestos a una o dos RF y el tiempo de exposición ( $p = 0.874$ ).

La actividad inflamatoria, medida a través de la cuantificación de la expresión de TNF- $\alpha$ , aumentó significativamente en la línea celular RAW 264.7 expuesta a radiación combinada en el Grupo III (900 + 2450 MHz) después de 72 h de exposición, en comparación con el mismo grupo después de 4 h de exposición ( $p = 0.009$ ). (Figura 19B).

#### 4.3.4 Actividad fagocítica.

La diferencia entre el valor promedio de las medias de los grupos (GI, GII, GIII y GIV) fue estadísticamente significativa ( $p \leq 0.001$ ) y mayor de lo que cabría esperar por azar después de tener en cuenta los diferentes resultados en los tiempos de exposición. Se utilizó un test de comparaciones múltiples para analizar las diferencias entre los grupos.

La diferencia entre el valor promedio de las medias de los tiempos de exposición fue estadísticamente significativa ( $p \leq 0.001$ ) y mayor de lo que cabría esperar por azar, después de tener en cuenta el efecto de la exposición de los diferentes grupos de RF. Se utilizó un test de comparaciones múltiples para analizar las diferencias entre los grupos.

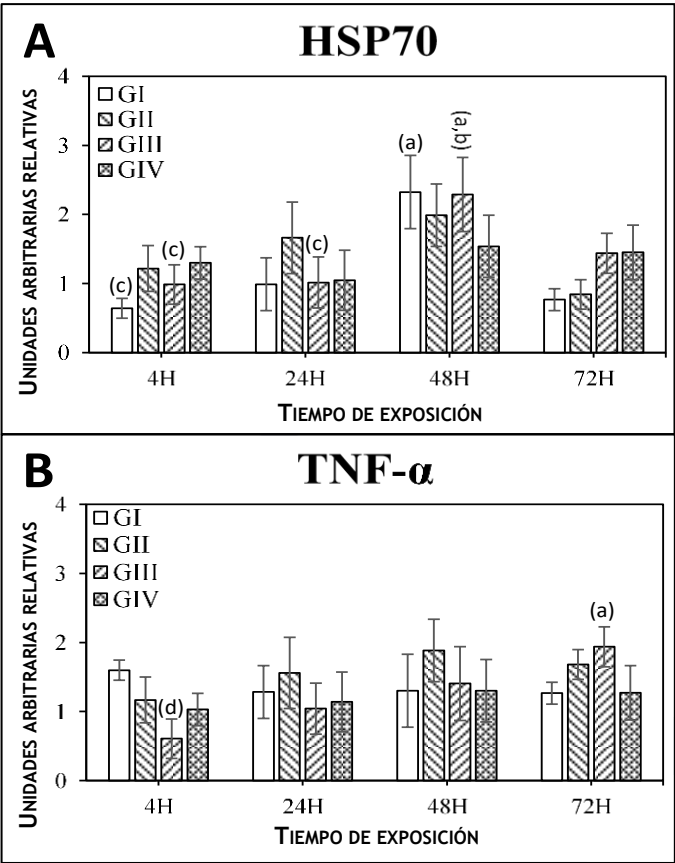
El efecto en los grupos expuestos a una o dos frecuencias dependió del tiempo de exposición. Hubo interacción estadísticamente significativa entre los grupos y el tiempo de exposición. ( $p = 0.001$ ).

La actividad fagocítica en la línea celular de macrófagos RAW 264.7 disminuyó significativamente en el Grupo II (2450 MHz) ( $p \leq 0.010$ ) (Figura 21) y Grupo III (900 + 2450 MHz) ( $p \leq 0.010$ ) en comparación con el grupo no radiado (GIV) para todos los tiempos de exposición a la radiación. Sin embargo, en el Grupo I, mostró una disminución significativa de la actividad fagocítica en comparación con el grupo no radiado solo apareció a las 4 h ( $p = 0.013$ ) y 72 h ( $p = 0.013$ ) (Figura 20).

La actividad fagocítica disminuyó significativamente en relación al tiempo de exposición. Observamos una disminución significativa en los valores de actividad fagocítica del grupo III (900 + 2450 MHz) de cultivos radiados expuestos durante 24 h ( $p = 0.013$ ), 48 h ( $p = 0.010$ ) y 72 h ( $p = 0.009$ ), en comparación con los valores después de la exposición a las 4 horas. (Figura 22)

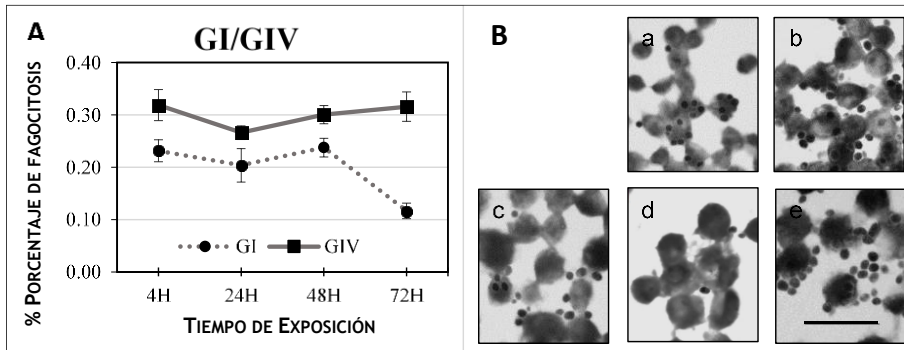
Finalmente, en los Grupos I (900 MHz) y II (2450 MHz), que estuvieron expuestos a radiación de una sola frecuencia, encontramos una disminución significativa en la actividad fagocítica después de la exposición durante 72 h en comparación con los grupos expuestos durante 4 h ( $p = 0.010$ ), 24 h ( $p \leq 0.013$ ) o 48 h ( $p \leq 0.013$ ).



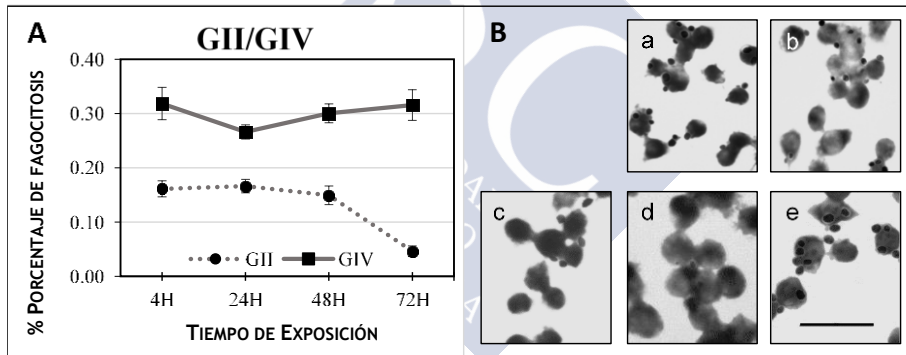


**Figura 19.** Histogramas de la expresión del ARNm de las proteínas HSP70 (A) y TNF- $\alpha$  (B) en relación al tiempo en GI (900 MHz), GII (2450 MHz), GIII (900 + 2450 MHz) y GIV (no radiado). Los valores muestran las medias (12 muestras) de los grupos radiados (GI, GII y GIII) y el grupo no radiado (GIV). Las barras de error indican el error estándar de la media (SEM) dentro de cada grupo (radiado o no radiado) (López-Furelos y col. 2018).

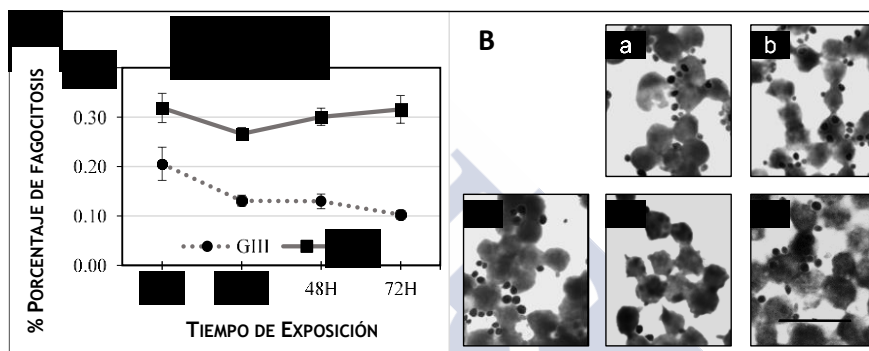
a,b,c,d Indica diferencias significativas de cada grupo radiado en relación con el tiempo: 4 h (a), 24 h (b), 48 h (c) y 72 h (d) ( $p < 0.05$ ).



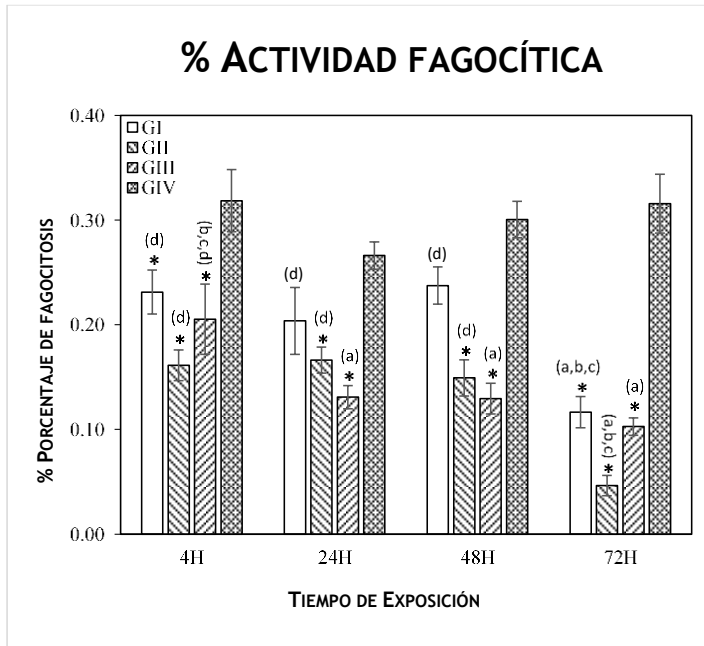
**Figura 20.** A. El gráfico que muestra la evolución (de 4 a 72 h) de la actividad fagocítica en el Grupo I (900 MHz) en comparación con el Grupo IV (no radiado). B. Las microfotografías muestran la internalización de las levaduras en los macrófagos del Grupo I a las 4 h (a), 24 h (b), 48 h (c) y 72 h (d), en comparación con el control (e). Fotografías tomadas a 100 aumentos. Se usaron 6 muestras para cada grupo / tiempo (López-Furelos y col. 2018).



**Figura 21.** A. El Gráfico que muestra la evolución (de 4 a 72 h) de la actividad fagocítica en el Grupo II (2450 MHz) en comparación con el Grupo IV (no radiado). B. Las microfotografías muestran la internalización de las levaduras en los macrófagos del Grupo II a las 4 h (a), 24 h (b), 48 h (c) y 72 h (d), en comparación con el control (e). Fotografías tomadas a 100 aumentos. Se usaron 6 muestras para cada grupo / tiempo (López-Furelos y col. 2018).



**Figura 22.** A.El Gráfico que muestra la evolución (de 4 a 72 h) de la actividad fagocítica en el Grupo III (900 MHz + 2450 MHz) en comparación con el Grupo IV (no radiado). B. Las microfotografías muestran la internalización de las levaduras en los macrófagos del Grupo III a las 4 h (a), 24 h (b), 48 h (c) y 72 h (d), en comparación con el control (e). Fotografías tomadas a 100 aumentos. Se usaron 6 muestras para cada grupo / tiempo (López-Furelos y col. 2018).



**Figura 23.** El Histograma que muestra el porcentaje de actividad fagocítica en relación al tiempo en GI (900 MHz), GII (2450 MHz), GIII (900 MHz + 2450 MHz) y GIV (no radiado). Los valores muestran las medias (9 muestras de 100 células cada una) de los grupos radiados (GI, GII y GIII) y el grupo no radiado (GIV). Las barras de error indican el error estándar de la media (SEM) dentro de cada grupo (radiado o no radiado). Se usaron 96 muestras, 6 para cada grupo / tiempo (López-Furelos y col. 2018).

\* Indica diferencias significativas en relación al grupo no radiado ( $p < 0.05$ ).

a,b,c,d Indica diferencias significativas de cada grupo radiado en relación al tiempo, 4 h (a), 24 h (b), 48 h (c) y 72 h (d) ( $p < 0.05$ ).

## V. DISCUSIÓN

### **5.1. DISCUSIÓN DEL EXPERIMENTO I: *UN SISTEMA EXPERIMENTAL MULTI-FRECUENCIA PARA ESTUDIAR LA DOSIMETRÍA Y EFECTOS AGUDOS SOBRE LA MORFOLOGÍA CELULAR Y NUCLEAR EN TEJIDOS DE RATA.***

En esta investigación, 1) llevamos a cabo la prueba de un sistema de radiación multifrecuencia que permite la exposición simultánea de ratas o de animales de un tamaño similar, a señales electromagnéticas (EM) de dos frecuencias diferentes en la banda de 800-2700MHz; 2) obtuvimos valores de SAR para los tejidos más representativos de una rata estándar, radiada a 900 MHz, 2450MHz y a una combinación a igual potencia de estas dos frecuencias ( $P_{TR} = 2 \text{ W}$ ) y posteriormente escalamos estos valores de SAR para ratas experimentales reales. 3) Observamos los efectos de las señales de estas dos frecuencias simultáneas en las células de estos tejidos, en comparación con los efectos de las señales de una sola frecuencia, la radiación gamma o la no exposición. Conforme a la legislación española (REAL DECRETO 1066/2001) e internacional (ICNIRP, 1998), y a los pocos estudios previos de exposición multifrecuencia, los valores de SAR para la exposición a la señal mixta se calcularon como el promedio ponderado de la potencia de las exposiciones de frecuencia única. La ausencia de detección de efectos biológicos de la radiación EM en los experimentos con ratas impidió la evaluación de si este procedimiento promediado es realmente válido, o si los efectos de las señales multifrecuencia, cuando ocurren, difieren de alguna manera de los efectos de las frecuencias de forma individual, y de si la absorción estimada se correlaciona con los efectos biológicos en los niveles de exposición empleados. Dado que los diferentes órganos no son todos sensibles a la radiación EM de igual forma (aunque solo sea por su ubicación anatómica diferente), examinamos los efectos de la radiación en ocho tejidos diferentes.

Dado que la región del cuerpo humano que absorbe más energía durante el uso de un teléfono celular es la cabeza, ha habido una extensa investigación sobre los efectos de la radiación no ionizante, en las frecuencias de los teléfonos móviles, en la cabeza de mamíferos pequeños y en los tejidos del sistema nervioso. Los autores que trabajaron a 900 o 2450 MHz informaron que los efectos agudos en la corteza cerebral y el cuerpo estriado, como la gliosis, la activación neuronal y el estrés celular, están asociados con niveles cerebrales de SAR promedios desde 6.0 W/ kg a picos promedio de 1 g a 0.3 W / kg (Mausset-Bonnefont y col., 2004; López-Martín y col., 2008; Jorge-Mora y col., 2010). También se han observado alteraciones en las tasas de apoptosis neuronal o en vías apoptóticas no dependientes de caspasas después de la exposición única o repetida de ratas en todo el cuerpo o de líneas celulares neuronales humanas o animales (Kesari y col., 2011; Dasdag y col., 2009; Calabrò y col., 2012; Joubert y col., 2008; Zhao y col., 2006). En otros estudios, sin embargo, no se han observado efectos biológicos de la radiación de 0.8-2.0 GHz sobre la apoptosis en el tejido del sistema nervioso (Yilmaz y col., 2008; Kim y col., 2008; Moquet y col., 2008).

Los efectos de la radiación electromagnética sobre las células germinales y la fertilidad masculina han sido objeto de numerosos estudios que denuncian la práctica común de llevar un teléfono celular en un bolsillo cerca de los testículos. En ratas de 28 días de edad, después de la exposición repetida a radiación de 900 o 2450 MHz, se ha observado una espermatogénesis reducida, junto con una disminución del número de células de Leydig, un aumento del estrés oxidativo y la apoptosis en el tejido testicular (Saygin y col., 2011; Mailankot y col., 2009). Una vez más, sin embargo, la información disponible es contradictoria, en otros estudios después de la exposición de animales a radiofrecuencias únicas o combinadas no hay indicaciones morfológicas o bioquímicas sobre el aumento de la apoptosis (Jin y col., 2011; Lee y col., 2010) o de estados preapoptóticos con una mayor actividad de caspasa (Falzone y col., 2010; Dasdag y col., 2007) en células sexuales masculinas.

Los órganos linfoides como el timo parecen ser particularmente sensibles a los campos electromagnéticos. Se ha encontrado que las ratas inmaduras tienen altos niveles de estrés oxidativo irreversible después de la exposición a una radiación de 900 MHz (Aydin y col.,

2011), y la exposición repetida a 42 GHz se ha asociado con una respuesta inmunogénica alterada (Lushnikov y col., 2011). La involución tímica durante la exposición prolongada a 50 Hz de radiación (Quaglino y col., 2000) se acelera por la exposición continua a la luz (Quaglino y col., 2004).

El tejido graso también es sensible a las RF, se ha observado lisis de adipocitos después de la exposición repetida a microondas de 2.4 MHz (Trelles y col., 2009), también se puede observar inflamación y disminución del recuento de células a 6 MHz (De Felipe y col., 2007).

Se ha encontrado que la exposición repetida del músculo esquelético a radiación de 2450 MHz causa fatiga, una disminución de la actividad de la acetilcolinesterasa (Vukova y col., 2005; Radicheva y col., 2002) y reduce el volumen muscular (Jin y col., 2007). Sin embargo, una revisión relevante nombró varios estudios *in vitro* y crónicos *in vivo*, de múltiples tejidos animales donde no encontraron un aumento en la apoptosis celular o en respuesta a la exposición 800-3000 MHz a niveles subtérmicos de RF (Meltz, 2003).

La exposición del mundo real a la contaminación electromagnética, en espacios públicos o privados, no suele implicar una sola frecuencia, sino la interacción de varias RF (Paniagua y col., 2009). Ha habido varios informes de que los niveles subtérmicos de radiación ionizante ultravioleta o gamma pueden aumentar la apoptosis, en respuesta a la radiación (Markkanen y col., 2004; Cao y col., 2009). Los estudios que investigan si tal sinergia se extiende a la exposición a múltiples RF han sido pocos, y sus resultados, como el nuestro, son negativos, ya sean epidemiológicos (Lee y col., 2009; Lee y col., 2012) o experimentales (Lee y col., 2011; Jin y col., 2011; Thomas y col., 2008a; 2008b). En el presente caso, la ausencia de efectos significativos puede deberse en parte, a las bajas tasas de absorción específicas empleadas ( $< 0.3 \text{ W / kg}$  excepto en la hipófisis del grupo 3) y al uso de un solo período de exposición única en lugar de exposiciones repetidas. El sistema de radiación multifrecuencia diseñado para este estudio facilitará la realización de más experimentos dirigidos a una caracterización más completa de los efectos biológicos en animales expuestos a la radiación de multifrecuencia.

## **5.2. DISCUSIÓN DEL EXPERIMENTO II: *EVIDENCIA DEL ESTRÉS CELULAR Y DE LA CASPASA-3 RESULTANTE DE UNA SEÑAL COMBINADA DE DOS FRECUENCIAS EN EL CEREBRO Y EL CEREBELO DE RATAS SPRAGUE-DAWLEY.***

En un estudio previo que comparó los efectos biológicos de una sola RF con los de dos señales simultáneas de RF, la aparente ausencia de efectos biológicos en la morfología de los tejidos de rata no fue concluyente (López-Furelos y col., 2012). En contraste, el trabajo actual nos permitió determinar experimentalmente que los efectos biológicos de la interacción simultánea de dos radiofrecuencias no eran ni aditivas ni mayores que los efectos al aplicar cada señal por separado. No hemos encontrado estudios previos a los resultados obtenidos en este trabajo, así con la exposición a una o dos fuentes de radiación, a niveles de SAR subtérmicos, el estrés térmico celular aumentó (Hsp), así como los indicadores preapoptóticos (caspasa-3) y se observaron diferentes respuestas entre los hemisferios derecho e izquierdo de la corteza cerebral o el cerebelo de roedores. A diferencia de otros modelos experimentales que examinan los efectos de la exposición combinada a RF en células neuronales (Kang y col., 2014), tejido testicular (Lee H.J. y col., 2012), así como también cambios en la morfología del tejido, la función o el ciclo celular con exposición crónica (Jin y col., 2011), no eran evidentes. Aunque estudios epidemiológicos recientes han informado de síntomas de cefalea e insomnio en diferentes grupos de población humana expuestos a RF combinadas (Thomas y col., 2008a; 2008b), la causa aún se está debatiendo y aún no se sabe si la exposición combinada a la radiación de varias fuentes podría tener efectos relevantes sobre la salud.

En este trabajo experimental observamos parámetros de radiación que actuaron independientemente del número de RF aplicadas. Por lo tanto, a pesar de la aparente atenuación del efecto biológico de la radiación combinada con respecto a la radiación única, el aumento del SAR  $> 0.33 \text{ W / kg}$  provocó incrementos importantes en los niveles de HSP, como ha sido descrito por otros autores para la frecuencia única de 2450. MHz (Yang y col., 2012) a un mayor SAR ( $6 \text{ W / kg}$ ). El tiempo de exposición a los campos electromagnéticos también puede jugar un papel importante en el aumento de HSP (Calabrò y col., 2012; Yang y col., 2012), aunque los niveles de estrés medidos mediante la temperatura rectal (Dallmann y col., 2006; Misa Agustino y col., 2012)



inmediatamente después de la radiación disminuyeron en los animales que fueron inmovilizados durante dos horas. La explicación está relacionada con una disminución o compensación de los niveles de estrés que contrarrestan posibles aumentos en la temperatura animal. El hipotálamo es el centro de regulación térmica en los mamíferos y mantiene la homeostasis, ajustando la temperatura corporal (Mason y col., 1997; Michaelson, 1982). Estamos trabajando con las siguientes hipótesis explicativas: a) el estrés inicial de la inmovilización de los animales provoca un aumento brusco de la temperatura (en periodos cortos como 1 hora en el Experimento 1) que desaparecerá durante períodos más largos (2 h en el Experimento 2) cuando el animal se acostumbra a la inmovilización; y b) la radiación puede provocar la estimulación de los receptores de opiáceos. Puede haber un equilibrio entre el efecto potencialmente analgésico (Verginadis y col., 2012) de la exposición aguda a los campos electromagnéticos y el estímulo agudo de la inmovilización (durante una o dos h en este caso) que genera estrés y aumenta los niveles de cortisol (Filipovic y col., 2008).

Otro hallazgo importante fueron las diferencias significativas en los niveles de Hsp que observamos entre los hemisferios de la corteza cerebral y el cerebelo 24 h después de la radiación en ambos niveles de SAR estudiados. Las diferencias fueron más pronunciadas en el SAR más alto. La causa de estas diferencias podría estar relacionada con pequeñas variaciones en la intensidad del CEM, que previamente se había comprobado experimentalmente en ambos lados de las cabezas de los animales. Esto explicaría la mayor lateralidad de la respuesta de la proteína en el hemisferio izquierdo, que también se ha observado en la excitabilidad cerebral de los hemisferios (Ferri y col., 2006) o la proliferación celular (Hardell y col., 2013) en los seres humanos expuestos a la radiación de los teléfonos móviles. En consecuencia, el lado izquierdo recibió valores de CEM más altos que el derecho, lo que tendría diferentes repercusiones en la corteza cerebral y el cerebelo dependiendo de la ubicación. Curiosamente, el hemisferio izquierdo de la corteza cerebral presentó niveles significativamente menores de Hsp90 en los grupos de animales expuestos a una o dos radiofrecuencias. La disminución de esta proteína constitutiva de las células nerviosas (Gass y col., 1994; D'Souza, 1998) podría indicar un grado de vulnerabilidad neuronal (Kim y col., 2013). En contraste, los altos niveles de Hsp70 en el hemisferio izquierdo de animales expuestos

a una sola frecuencia han sido descritos por algunos autores como neuroprotección (Dobrachinski y col., 2014). Ambas proteínas se elevaron en el hemisferio izquierdo del cerebelo, lo que indica un equilibrio entre los mecanismos antiapoptóticos / pre-apoptóticos (Reynolds y col., 2003; Chen y col., 2004). A pesar de la acción conjunta y complementaria de ambas proteínas (Richter y col., 2010), los niveles de proteínas preapoptóticas aumentaron significativamente en los animales expuestos a los niveles más altos de RF (Grupo II, 2450 MHz).

En los resultados descritos aquí, ninguna de las Hsp alcanzó niveles significativamente diferentes de los valores del control en los tejidos de la corteza cerebral y el cerebelo de ratas expuestas a la interacción de dos radiofrecuencias (Grupo III) (Ver Figuras 13 y 14A, 14B, 14C, 14D). Algunos autores sugieren que la exposición a una radiofrecuencia, en mamíferos, puede estimular el estrés celular al provocar una mayor expresión de Hsp y aumentar el riesgo de cáncer (French y col., 2001). Sin embargo, se ha revisado desde entonces resultados de diversos experimentos *in vivo* o *in vitro* que describen cambios en la expresión de la proteína después de la exposición a radiación no ionizante (McNamee y col., 2009), algunos fueron controvertidos y otros no pudieron ser replicados. Durante este experimento, el análisis de los marcadores de estrés obtenidos de los tejidos de ratas expuestas a radiación, se compararon en todo momento con animales control no expuestos y en condiciones experimentales idénticas (inmovilizados durante la misma cantidad de tiempo en la cámara. Esto permitió analizar con una mayor seguridad los datos que obtuvimos.

La chaperona Hsp70 alcanza sus niveles más altos y más persistentes en la corteza cerebral y el cerebelo 24 h después de la radiación (dos h de exposición) en animales expuestos a una frecuencia única y al SAR más alto. Esta proteína citoprotectora actúa para preservar y restaurar las proteínas celulares que están bajo estrés (Benjamin y col., 1998) a partir de estímulos como la hipertermia (Chen y col., 2007), la isquemia (Ouyang y col., 2013, Sun y col., 2005) y / o el estrés oxidativo (Hardas y col., 2012). Los niveles de Hsp70 están regulados por corticoides circulantes (Dong y col., 1998), pero no hay relación con los niveles de glucocorticoides o la naturaleza del estímulo agudo (Filipovic y col., 2008). La sensibilidad tisular al estrés está

determinada por los receptores de glucocorticoides (RG), que en investigaciones recientes se indica que están regulados conjuntamente a través de la acción coordinada de las Hsp90 y 70 (Kirschke y col., 2014). Esto corrobora los recientes hallazgos de nuestro laboratorio, en los cuales la presencia de RG en timocitos de rata después de una exposición idéntica en la cámara GTEM a 2,45 GHz aumenta con el aumento del SAR y el tiempo después de la exposición (Misa-Agustiño y col., 2015).

En trabajos previos, se observó que la interacción aguda de varias radiofrecuencias a un SAR no térmico no aumenta la apoptosis celular en ocho tipos de tejido diferentes (López-Furelos y col., 2012). Sin embargo, en el trabajo actual encontramos un aumento significativo de la actividad pre-apoptótica (ver Resultados). Esto fue descrito por otros autores después de la radiación *in vitro* de la línea celular PC12 (Zuo y col., 2014; 2015) o después de una exposición *in vivo* de uno o dos meses (Kesari y col., 2011). Sin embargo, la sobreexpresión de Hsp70 en la corteza cerebral de animales expuestos a una RF de 900 o 2450 MHz atenúa la caspasa-3 (Calabrò y col., 2012) e inhibe la apoptosis neuronal (Sabirzhanov y col., 2012), disminuyendo así la isquemia cerebral en los astrocitos (Giffard y col., 2004) y manteniendo la fisiología mitocondrial durante el estrés inducido por la privación de glucosa en los astrocitos (Ouyang y col., 2006).

El SAR o proporción de energía depositada por unidad de masa en los tejidos corporales, es el índice biológico utilizado para determinar los efectos biológicos y las restricciones básicas en relación con la exposición humana a la radiación (ICNIRP, 2009; SCC39, 2005). En este trabajo, el SAR se calculó mediante el método de simulación numérica FDTD. Debido a las limitaciones del programa, los SAR de cada RF se promediaron para obtener el SAR para ambas frecuencias (Schmid & Partner Engineering AG, 2009), que solo se aproxima a la realidad. En el modelo de radiación experimental estudiado y analizado aquí, no se encontró relación lineal entre la exposición electromagnética y los efectos biológicos, ya que no siguió una relación dosis-respuesta lineal. Varios de nuestros propios experimentos y trabajos de otros investigadores (Eberhardt y col., 2008; Jorge-Mora y col., 2011; Misa Agustino y col., 2012), confirman que un mayor SAR no necesariamente induce una mayor respuesta biológica. Algunos autores consideran que el SAR no debe usarse como un predictor de efectos

biológicos o como una propiedad cuantitativa de la dosimetría para describir efectos no térmicos (Panagopoulos y col., 2013).

Nuestra hipótesis concluyente, basada en los resultados biológicos de este experimento, es que los efectos biológicos aditivos no existen cuando dos señales combinadas de diferentes frecuencias actúan simultáneamente. Como mencionamos anteriormente (Resultados, Sección 4.2.1.) nuestro primer argumento de apoyo se basa en la visualización experimental en el laboratorio de la señal resultante con un osciloscopio en, utilizando frecuencias más bajas que las aplicadas en el experimento. La señal combinada adquirió una morfología completamente diferente a cualquiera de las RF individuales (ver la simulación de la señal combinada, (Figura 12A), adoptando una forma similar a una onda modulada. Esto podría ubicar el debate sobre la propuesta de que el mecanismo de acción de las señales combinadas es similar a de la radiofrecuencia modulada por pulsos (Juutilainen y col., 2011), que algunos autores asocian con efectos biológicos específicos de la radiación no ionizante en el sistema nervioso humano. Las señales moduladas de RF provocan alteraciones en los electroencefalogramas correspondientes al sueño (Huber y col., 2002), vigilia (Hinrikus y col., 2011; Perentos y col., 2007), flujo cerebral (Huber y col., 2005), pruebas de rendimiento de memoria (Regel y col., 2007) en humanos o modelos experimentales convulsivos (López-Martín y col., 2009) en la barrera hematoencefálica (Salford y col., 1994) de ratas. No obstante, muchos autores no aceptan que la especificidad de esos efectos biológicos no térmicos esté relacionada con la radiación con ondas moduladas (Balzano y col., 2012).

La legislación de la Unión Europea, incluido España (Reglamento que establece condiciones de protección para la radioelectricidad de dominio público, 2001), considera que, en situaciones de exposición simultánea a diferentes frecuencias, debe tenerse en cuenta para la protección pública la posibilidad de efectos acumulativos en la exposición. Sin embargo, no hay evidencia de un mecanismo de interacción múltiple, y por lo tanto de la efectividad de esos límites (López-Furelos y col., 2012).

### **5.3. DISCUSIÓN DEL EXPERIMENTO III: LA EXPOSICIÓN A LA RADIACIÓN DE RADIO-FRECUENCIAS SIMPLES O COMBINADAS PROVOCA LA DISFUNCIÓN DE LOS MACRÓFAGOS EN LA LÍNEA CELULAR RAW 264.7.**

No conocemos ningún estudio experimental previo que describa cambios en la actividad inmunitaria debido a la interacción de radiofrecuencias únicas o combinadas en los macrófagos de la línea celular RAW 264.7. La escasa investigación realizada sobre campos magnéticos, bajas frecuencias y pulsos de banda ultraancha, ofrece hallazgos contradictorios (Maresuke y col., 2016; Glushkova y col., 2015; Seaman y col., 2002). En este estudio, encontramos que la interacción de una o más frecuencias causó una disminución significativa en la actividad fagocítica de los macrófagos. Además, las respuestas antiinflamatorias y citoprotectoras dependieron especialmente del tiempo de exposición cuando interactuó con los macrófagos la combinación de las dos señales de RF.

En el presente estudio, no se evidenciaron cambios en la viabilidad de la línea celular RAW 264.7 cuando se expuso a la radiación de múltiples frecuencias durante diferentes períodos de tiempo. Estas observaciones corroboran otros estudios *in vivo* en los que no se detectaron cambios en el crecimiento tumoral después de la exposición a una frecuencia cercana a 900 MHz (Bartsch y col., 2002, Heikkinen y col., 2001; Higashikubo y col., 1999). De igual modo, en un estudio diferente, después de la exposición de ratas a 2140 MHz durante 20 h / día, no se observaron efectos tras tres generaciones (Tomoyuki y col., 2014). En estudios realizados sobre líneas celulares expuestas a baja frecuencia, no se encontraron diferencias significativas en la viabilidad debido a la radiación en la línea celular de macrófagos U937 (Karolina y col., 2014). Estudios *in vitro* realizados en células de glioma de rata expuestas a 836.55 MHz, no mostraron evidencia de aumento o disminución en la proliferación celular cuando las células se expusieron durante 24 h en una cámara TEM, a niveles de SAR que varían de 0.15 a 15 mW / kg (Stagg y col., 1997). En otro estudio que utilizó una RF de 900 MHz, no se detectaron alteraciones en la viabilidad de la línea celular U937 o de la línea celular de neuroblastoma SK-N-SH (Ebru y col., 2006). Cuando se radiaron las líneas celulares de glioblastoma humano U251 y A172 y la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y a 1800 MHz y 4,0 W / kg SAR durante un máximo de 24 h, no

hubo evidencia de que la radiación influyera en la viabilidad (Liling y col., 2017). Nuevamente, cuando la línea A172 se expuso a una RF de 2450 MHz, no se detectaron disminuciones importantes en la viabilidad mientras el SAR permaneció entre 5 y 100 W / Kg, aunque se observó una disminución del 70% en la viabilidad a un SAR de 200W / Kg (Wang y col., 2006). Todos estos estudios respaldan nuestros hallazgos en lo que no hubo cambios en la viabilidad de los macrófagos de la línea celular RAW 264.7 en las condiciones aplicadas en el presente trabajo.

Algunos datos parecen indicar que los niveles de NO aumentaron cuando órganos tales como: pulmones, hígado, testículos y corazón, o tejido mamario o moco nasal se radiaron a 900 MHz (Meric y col., 2011; Yarikta y col., 2005). El tiempo de exposición también fue crucial: a 900 MHz, durante períodos cortos (30 minutos / día durante 7 días), los niveles de producción de NO no se alteraron, pero los niveles de este biomarcador aumentaron tras 12 h de exposición / día durante 30 días (Irmak y col., 2002). En nuestro estudio, la exposición de la línea celular de macrófagos RAW 264.7 a una radiación de 900 MHz no pareció aumentar los niveles de estrés lo suficiente como para registrar una diferencia significativa en los niveles de NO ( $p = 0,17$ ). Otros autores tampoco encontraron diferencias en la producción de NO después de la radiación de la línea celular RAW 264.7 a 50 Hz (Maresuke y col., 2016). La producción de NO después de una exposición de 30 minutos en una cámara GTEM, a un pulso de banda ultraancha durante 1 ns o a la exposición repetida a 600 Hz y aproximadamente 0,106 W / kg de SAR, no alteró significativamente la línea celular RAW 264.7 (Seaman, 2002). Los resultados de la RF de 2450 MHz están respaldados por estudios previos en los que la respuesta temprana a la radiación produjo un aumento en la producción de NO y una posterior disminución con el tiempo hasta alcanzar niveles normales, en el cerebro de ratas radiadas a 2100 MHz (Hidisoglu y col., 2016). Por el contrario, los resultados de nuestro experimento (Figura 18) mostraron que los macrófagos del grupo expuesto a frecuencias combinadas (Grupo III) sufrieron, a las 48 h, una atenuación de la respuesta inicial seguido de un incremento drástico en la producción de NO, a las 72 h de exposición. Esto puede indicar un retraso en la producción de NO que se normalizaría a las 72 h o incluso aumentaría con mayores tiempos de exposición.



Normalmente, un aumento en la producción de NO conduciría a la activación de la expresión de Hsp70, esta sirve para proteger las células del estrés térmico y oxidativo y ayuda a evitar la pérdida de la estructura de la proteína (Tavaria M y col., 1996). El crecimiento celular en un ambiente oxidativo induce la expresión del TNF- $\alpha$ , que es crucial para el desarrollo tanto de una respuesta protectora contra infecciones como de la actividad inmunológica que puede destruir células tumorales (Hirvonen y col., 1996.; Petrini y col., 1997).

En el presente estudio, no hubo cambios significativos en la expresión de la Hsp70 después de la exposición a RF única o combinada (900 MHz, 2450 MHz). A una RF de 2450 MHz, nuestros resultados fueron respaldados por estudios previos en los cuales, no aparecieron diferencias significativas en la expresión de la Hsp70 en tejido tiroideo de rata, después de 90 min o 24 h de la exposición a una radiación de 12 W de potencia (Misa Agustino y col., 2012). De manera similar, no se encontraron signos de cambios en la concentración de la Hsp70 en los cerebros de las ratas expuestas a una RF de 900 MHz y un SAR de 7.5 W / kg (Fritze y col., 1997), tampoco a 900 MHz o 1800 MHz con un SAR menor o igual a 5 W / kg durante 2 h por día durante 12 semanas (Sandrine y col., 2008). De nuevo, la exposición de la línea celular humana Mono Mac 6 a 1800 MHz no cambió los niveles de expresión de la Hsp70 (Simkó y col., 2006).

En este trabajo, la expresión aumentada del ARNm de la Hsp70 después de 48 h de exposición en todos los grupos estudiados puede explicarse por un mecanismo similar al que se ha observado en exposiciones a bajas frecuencias. Algunos autores observaron que la expresión del ARNm de la Hsp72 aumentó después de 15 minutos de exposición a 1mT, aunque la concentración de la Hsp72 no lo hizo. Argumentaron que la activación del gen Hsp72 era independiente de la síntesis de proteínas (Gottwald y col., 2007). Otra explicación puede ser que la combinación de diversas fuentes de estrés y la exposición a la radiación electromagnética, generó una disminución en la actividad de algunas enzimas, provocando una inhibición temporal de las RNAsas y la estabilización de ARNm de la Hsp70 (Roberta y col., 2006).

Al igual que con la expresión de la Hsp70, los siguientes estudios parecen demostrar que los efectos de la radiación en la expresión de TNF- $\alpha$  están muy influenciados por el tipo de tejido radiado y la frecuencia de exposición. En extractos del hipocampo de cerebro de

rata, se observó un aumento en los niveles de TNF- $\alpha$  a RF de 900, 1800 y 2450 MHz y un SAR = 0.59 mW / kg en una cámara GTEM, cuando el tejido estuvo expuesto durante 2 h / día (5 días / semana) durante 60 días (Megha y col., 2015). En el tejido nervioso, se observó un aumento de la producción de la TNF- $\alpha$  en la línea celular microglial N9 cuando se expuso a 1800 MHz y 2450 MHz, pero no se encontraron cambios en la producción de la línea celular de astroglía C8-D1A (Lu y col., 2014; Yang y col., 2010). En contraste con estos estudios y en apoyo de lo que ocurrió en la astroglía, la exposición de cultivos de células primarias microgliales de ratas recién nacidas a RF de 1950 MHz y a un SAR de 0.2, 0.8 y 2.0 W / kg no provocó cambios en la producción de TNF- $\alpha$  (Hirose y col., 2010). En otros tejidos, no se detectaron efectos de la exposición de pacientes con dermatitis atópica a una RF que procedía de una antena telefónica de 900 MHz y un SAR de 1 W / kg durante 30 minutos (Johansson y col., 2008). Del mismo modo, no hubo cambios en la producción de TNF- $\alpha$  en el tejido testicular de ratas expuestas a 2450 MHz y un SAR de 3,21 W / kg durante 60 minutos / día y durante 28 días (Saygin y col., 2011).

Al aplicar campos electromagnéticos de baja frecuencias, observamos resultados contradictorios que indican que la expresión de la TNF- $\alpha$  aumenta en macrófagos intraperitoneales (Makar y col., 2006), mientras que la TNF- $\alpha$  producida por fagocitos mononucleares disminuye significativamente (Ignacio y col., 2011). De forma similar, a 50 y 60 Hz, la producción de TNF- $\alpha$  y las funciones inmunitarias no cambiaron en células mononucleares de sangre periférica humana (Ikeda y col., 2003).

En consonancia con nuestros resultados, encontramos que en células inmunes humanas extraídas de donantes de sangre radiadas mediante pulsos a 1950 MHz y un SAR de 1 W / Kg durante 8 horas, no hubo diferencias en la síntesis de la TNF- $\alpha$  en comparación con los monocitos control (Helga y col., 2006). A partir de esto, asumimos que tenemos razón al afirmar que las diversas frecuencias y los tiempos de exposición de nuestro estudio no provocaron cambios en la producción de TNF- $\alpha$ . Sin embargo, realizamos un hallazgo especialmente significativo en nuestra investigación que fue el importante aumento de los niveles de TNF- $\alpha$  tras 72 h de exposición de la línea de macrófagos RAW 264.7 a la interacción combinada de ambas RF (Grupo III) (Fig. 19). De esto deducimos que la respuesta inflamatoria de los macrófagos



aumenta con la exposición continua y combinada de múltiples señales de RF. Esto podría apuntar a importantes repercusiones en los sistemas inmunes de los mamíferos en un mundo donde las radiofrecuencias múltiples interactúan constantemente.

La fagocitosis se puede considerar como un medio de defensa contra los microorganismos invasores, así como también de eliminación (o incluso el reciclaje) de los tejidos muertos. Por lo tanto, la modificación de este rasgo en los macrófagos pondría en peligro la integridad de la respuesta inmune y el correcto funcionamiento de los procesos bioquímicos relacionados con la metabolización de sustancias no deseadas (Regueiro-González y col., 2011). Nuestros resultados muestran una disminución de la actividad fagocítica que es más precoz en el Grupo III y aumenta después de 72 h de exposición continua (ver Fig. 23). Los estudios de otros autores en sangre periférica de rata informaron que la actividad fagocítica de los neutrófilos se suprimió aproximadamente en un 50% después de 2 a 3 h de exposición a frecuencia alta e intensidad baja (42,0 GHz, 0,15 mW / cm<sup>2</sup>, 20 minutos diarios). El efecto duró 1 día y desapareció por completo después de 3 días (Kolomytseva y col., 2002). Otro estudio informó de una reducción de la fagocitosis microglial después de la exposición durante 20 minutos a ondas pulsadas a 2,45 GHz y un SAR de 6 W / kg SAR (He y col., 2014). También encontramos resultados similares a los nuestros, que indican una disminución de la fagocitosis en macrófagos murinos tras la exposición a radiofrecuencias de 2,45 GHz (Mayers y Habeshaw, 1973).

Otros estudios en líneas de macrófagos peritoneales murinos expuestos a radiación no ionizante han descrito un aumento de la actividad fagocítica (Zafra y col., 1988). Sin embargo, la exposición de la línea celular HL60 a 2.45 GHz y un SAR de 2 o 10 W / kg durante 4 y 24 h produjo muy poco o ningún efecto sobre la fagocitosis a 2 W / kg SAR, que es el valor máximo recomendado por la ICNIRP (Comisión Internacional para la Protección contra la Radiación no Ionizante), o a 10 W / kg SAR. (Koyama y col., 2015).

#### **5.4. VALORACIONES FINALES.**

La línea de investigación de esta tesis doctoral se basa en el principio de que los efectos sobre los seres vivos de la combinación de las RF reproducen con mayor exactitud un escenario real que aquellos

modelos que emplean una sola RF, dado que los efectos de las frecuencias aisladas son diferentes a la combinación de ellas.

Conforme a la legislación española (REAL DECRETO 1066/2001 e internacional (ICNIRP, 1998), los valores de SAR para la exposición a frecuencias combinadas deben ser calculados como el promedio ponderado de la potencia de las exposiciones de frecuencia por separado.

Durante los estudios que realizamos, no se encontró relación lineal entre la exposición electromagnética y los efectos biológicos, ya que no siguió una relación dosis-respuesta lineal. Varios de nuestros propios experimentos y trabajos de otros investigadores (Eberhardt y col., 2008; Jorge-Mora y col., 2011, Misa Agustiño y col., 2012), confirman que una mayor absorción de energía de los tejidos (SAR) no necesariamente induce una mayor respuesta biológica. Lo que contrastaría con lo indicado por la legislación que marca en SAR como indicador de respuesta biológica.

Durante el desarrollo de los estudios que llevamos a cabo para la realización de esta tesis, comenzamos realizando un estudio morfológico general en algunos de los tejidos más representativos de la anatomía corporal de la rata macho (López-Furelos y col., 2012), posteriormente, dado que la región del cuerpo humano que absorbe más energía durante el uso de un teléfono celular es la cabeza, realizamos una observación de la expresión de las proteínas citoprotectoras y de marcadores de apoptosis producidas por las RF a un nivel más específico, mediante la elección de los tejidos del SNC (Cerebro, cerebelo e hipófisis) como objeto de estudio (López-Furelos y col., 2016), para finalmente, adentrarnos en la expresión de marcadores citoprotectores, tumorales, de estrés oxidativo, viabilidad, crecimiento y mecanismos de acción a nivel celular mediante la investigación de los efectos de las RF en los macrófagos (RAW 264.7), una tipología clave del sistema inmunológico.

La ausencia de indicios claros de alteraciones en el estudio morfológico de 8 tejidos de rata macho Sprague-Dawley provocadas por la exposición a las radiaciones de estudio (900 o 2450 o 900 + 2450 MHz) nos indicaron que de existir cambios tenían que ser más sutiles y ocurrir a nivel metabólico, reservando las lesiones más graves para radiaciones a nivel térmico y radiaciones ionizantes.

Al igual que indican otros autores, los posteriores estudios parecen sustentar la que existe una clara influencia de las RF sobre la expresión de la proteína citoprotectora Hsp70 (Calabrò y col., 2012; Yang y col., 2012) o el estrés oxidativo (Meric y col., 2011; Yarikas y col., 2005), pudiendo desencadenar reacciones pro-apoptóticas testicular (Saygin y col., 2011; Mailankot y col., 2009).

Aunque actualmente, ha aumentado el número de laboratorios que estudian la interacción de las multifrecuencias, cabe destacar a otros autores pioneros en este campo como Lee H.J. (Lee y col., 2009; 2010; 2011; 2012) o Jin Y.B. (Jin y col., 2011; 2012; 2013) que centraron su investigación en los efectos de la tecnología CDMA y WCDMA. Pese a los avances en esta línea de investigación, nos encontramos con la gran barrera de que todavía existen pocos estudios que se centren en la observación de los efectos de estas interacciones y la gran mayoría de los resultados experimentales se deben comparar con resultados experimentales de frecuencias aisladas, un campo también reciente teniendo en cuenta las frecuencias que empleamos en nuestros estudios. Pese a esto, la aparición de nuevos autores que estudian el efecto combinado de las radiofrecuencias como Tomoyuki Shirai (Shirai y col., 2017) nos hacen creer que esta línea de investigación está hoy en día está más viva que nunca.

## VI. CONCLUSIONES

Las conclusiones extraídas de la realización de esta tesis doctoral son las siguientes:

**I.** Hemos desarrollado correctamente dos modelos experimentales *in vivo* (rata Sprague-Dawley) e *in vitro* (RAW 264.7) en un sistema de radiación que permite la combinación de frecuencias (900 + 2450 MHz) en una cámara de radiación GTEM e incorporado un sistema de termorregulación para el mantenimiento celular.

**II.** El análisis morfológico no reveló un daño apreciable en ninguno de los tejidos estudiados (cerebro, cerebelo, hipófisis, lengua, grasa, músculo, timo y testículo) ni cambios en la morfología de los núcleos celulares después de la exposición a radiación no ionizante, tanto en multi-frecuencias (900 + 2450 MHz) como en las frecuencias aisladas (900 MHz ó 2450 MHz). No hemos podido determinar si la suma de los SAR de ambas frecuencias constituye un indicador real del efecto biológico de la interacción de varias fuentes de radiofrecuencia.

**III.** El efecto biológico del estrés celular en la corteza cerebral y / o cerebelo está más relacionado con la naturaleza de la señal que cualquier acción aditiva de las dos frecuencias combinadas, lo que sugiere la posibilidad de un mecanismo de acción diferente cuando las señales múltiples actúan sobre el tejido. La interacción de las señales combinadas de dos radiofrecuencias, 900 y 2450 MHz, provoca la absorción de energía por tejido nervioso, pero no parece ser la suma de ambos SAR.

**IV.** Los efectos sub-térmicos de la señal de dos frecuencias combinadas constituyen un biosistema de estudio no lineal en el que no existe una relación lineal de causa-efecto.

**V.** Hemos observado un incremento de la respuesta inflamatoria con la exposición continuada que aumenta hasta las 72 h.

**VI.** Hay un claro incremento del estrés oxidativo 72 horas después de la interacción continua y combinada de 2 radiofrecuencias que se aprecia por la elevación de los niveles de óxido nítrico.

**VII.** Observamos un nivel máximo de citoprotección, determinado por los altos niveles de la proteína Hsp70, en los cultivos de la línea celular RAW 264.7 cuando se somete a la interacción de 900 MHz o ambas frecuencias combinadas (900 + 2450 MHz) durante 48 h.

**VIII.** Detectamos una máxima respuesta inflamatoria de los macrófagos, determinado por los altos niveles de TNF- $\alpha$ , cuando tiene lugar la interacción simultanea de ambas radiofrecuencias durante 72 h.

**IX.** Existe un significativo efecto inmunosupresor que se expresa a través de la disminución constante y continuada de la actividad fagocítica de los macrófagos sometidos a radiación de una o varias frecuencias.



## **VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ACGIH (American Conference of Government Industrial Hygienists)  
“Threshold limit values for chemical substances and physical agents and biological exposure indices” Cincinnati, OH: ACGIH, 1996
- Adair E.R., Adams B.W., "Microwaves modify thermoregulatory behavior in squirrel monkey", *Bioelectromagnetics*, 1: 1-20, 1980.
- Aitken R.J., Bennetts L.E, Sawyer D., Wiklendt A.M., King B.V.  
“Impact of radio frequency electromagnetic radiation on DNA integrity in the male germline”. *Int. J. Androl.* 28: 171–179. 2005.
- Akan Z., Aksu B., Tulunay A., Bilsel S., Inhan-Garip A. “Extremely low-frequency electromagnetic fields affect the immune response of monocyte-derived macrophages to pathogens”. *Bioelectromagnetics*, 31:603-612. 2010.
- Albert E.N., Sherif M, “Morphological changes in cerebellum of neonatal rats exposed to 2.45 GHz microwaves” *Prog Clin Biol Res*, 257: 135-51. 1988.
- Alnemri E.S., Livingston D.J., Nicholson D.W., Salvesen G., Thornberry N.A., Wong W.W., Yuan J. "Human ICE/CED-3 protease nomenclature". *Cell*, 87 (2): 171. 1996.
- Amere Subbarao Sreedhar, Peter Csermely. “Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy. A comprehensive review”. *Pharmacology & Therapeutics*, 101: 227–257. 2004.
- Anderson V., Joyner K.H. “Specific absorption rate levels measured in a phantom head exposed to radio frequency transmissions from

- analog hand-held mobile phones". *Bioelectromagnetics*, 16: 60-9. 1995.
- Ari, Markkanen., Piia. Penttinen ,Jonne. Naarala, Jukka Pelkonen, Ari-Pekka Sihvonen, and Jukka Juutilaine. "Apoptosis Induced by Ultraviolet Radiation Is Enhanced by Amplitude Modulated Radio frequency Radiation in Mutant Yeast Cells", *Bioelectromagnetics*, 25: 127-133. 2004.
- Aydin B., Akar A., "Effects of a 900-MHz electromagnetic field on oxidative stress parameters in rat lymphoid organs, polymorphonuclear leukocytes and plasma", *Arch Med Res.*, 42:, 261-7,2011.
- Balzano Q., Sheppard A.R. Comments on the article entitled "review of possible modulation-dependent biological effects of radiofrequency fields" by Juutilainen et al. *Bioelectromagnetics*, 33: 710-711. 2012.
- Banik S., Bandyopadhyay S., Ganguly S. "Bioeffects of microwave--a brief review". *Bioresour Technol*, 87: 155-159. 2003.
- Bartsch H., Bartsch C., Seebald E., Deerberg F., Dietz K., Vollrath L., Mecke D. "Chronic exposure to a GSM-like signal (mobile phone) does not stimulate the development of DMBA-induced mammary tumors in rats: results of three consecutive studies". *Radiat Res* 157:183-190. 2002.
- Beere H.M. 'The stress of dyng': the role of neat shock proteins in the regulation of apoptosis. *Jornal of Cell Science*. 117: 2641-2651. 2004.
- Belanger K., Leaderer B., Hellenbrand K., Holford T. R., McSharry J., Power M. E., Bracken M. B. "Spontaneous abortion and exposure to electric blankets and heated water beds". *Epidemiology*, 9: 36-42. 1998.
- Bellieni C.V., Nardi V., Buonocore G., Di Fabio S., Pinto I., Verrotti A. "Electromagnetic fields in neonatal incubators: the reasons for an alert". *J Matern Fetal Neonatal Med.*, 23:1-5. 2017.
- Benjamin I.J., McMillan D.R. "Stress (heat shock) proteins: molecular chaperones in cardiovascular biology and disease". *Circ Res.*, 83:117-132. 1998.
- Bernardi P., Cavagnaro M., Pisa S., Piuizzi E., "Specific Absorption Rate and Temperature Increases in the Head of a Cellular Phone

- User", IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques, 48: 1118-1126. 2000.
- Bernardini C., Zannoni A. Turba M.E., Bacci M.L., Forni M., Mesirca P., Remondini D., Castellani G., Bersani F. "Effects of 50 Hz sinusoidal magnetic fields on Hsp27, Hsp70, Hsp90 expression in porcine aortic endothelial cells (PAEC)". Bioelectromagnetics. 28:231-237. 2007.
- Bourdineaud J.P., Šrut M., Štambuk A., Tkalec M., Brèthes D., Malarić K., Klobučar G. "Electromagnetic fields at a mobile phone frequency (900 MHz) trigger the onset of general stress response along with DNA modifications in Eisenia fetida earthworms". Arh Hig Rada Toksikol., 68:142-152. 2017.
- Burkhard M. y col., "The effects of low-energy 69 Hz environmental electromagnetic fields upon the growth-related enzyme ornithine decarboxylase". Carcinogenesis, 8: 1385-1389. 1997.
- Buttke T., Sandstrom P. "Oxidative stress as a mediator of apoptosis". Immunol. Today, 15: 7-10. 1994.
- Calabrò E., Condello S., Currò M., Ferlazzo N., Caccamo D., Magazù S., Ientile "Modulation of heat shock protein response in SH-SY5Y by mobile phone microwaves." R.World J Biol Chem, 3: 34-40. 2012.
- Campdelacreu J. "Parkinson disease and Alzheimer disease: environmental risk factors". Neurologia, 29:541-549. 2014.
- Campisi A., Gulino M., Acquaviva R., Bellia P., Raciti G., Grasso R., Musumeci F., Vanella A., Triglia A. "Reactive oxygen species levels and DNA fragmentation on astrocytes in primary culture after acute exposure to low intensity microwave electromagnetic field". Neurosci Lett, 473:52-55. 2010.
- Cao Y., Zhang W., Lu M.X., Xu Q., Meng Q.Q., Nie J.H., Tong J. "900-MHz microwave radiation enhances gamma-ray adverse effects on SHG44 cell". J Toxicol Environ Health A., 72: 727-732. 2009.
- Caraglia M., Marra M., Mancinelli F., D'Ambrosio G., Massa R., Giordano A., Budillon A., Abbruzzese A., Bismuto E. "Electromagnetic fields at mobile phone frequency induce apoptosis and inactivation of the multi-chaperone complex in human epidermoid cancer cells". J Cell Physiol, 204: 539-548. 2005.



- Carballo-Quintás M., Martínez-Silva I., Cadarso-Suárez C., Alvarez-Figueiras M., Ares-Pena F.J., López-Martín E. "A study of neurotoxic biomarkers, c-fos and GFAP after acute exposure to GSM radiation at 900 MHz in the picrotoxin model of rat brains". *Neurotoxicology*, 32(4):478-494. 2011.
- Cardone M.H., Roy N., Stennicke H.R., Salvesen G.S., Franke T.F., Stanbridge E., Frisch S., Reed J.C. "Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation". *Science*, 282: 1318-1321. 1998.
- Çetkin M., Kızılkın N., Demirel C., Bozdağ Z., Erkıılıç S., Erbağcı H. "Quantitative changes in testicular structure and function in rat exposed to mobile phone radiation". *Andrologia*, 49. 2017.
- Challis L.J. "Mechanisms for interaction between RF fields and biological tissue". *Bioelectromagnetics*, 7: 98-106. 2005.
- Chen L.J., Su X.W., Qiu P.X., Huang Y.H., Yang J.M. "Thermal preconditioning protected cerebellar granule neurons of rats by modulating HSP70 expression". *Acta Pharmacol Sin.*, 25: 458-451. 2004.
- Chen S., Brown I.R. "Translocation of constitutively expressed heat shock protein Hsc70 to synapse-enriched areas of the cerebral cortex after hyperthermic stress". *J Neurosci Res.*, 85: 402-409. 2007.
- Chi S.H., Mestrl R. "Stable expression of a human HSP70 gene in a rat myogenic cell line confers protection against endotoxin". *Am J Physiol*, 270: 1017-1021. 1996.
- Chou C.K., Yee K.C., Guy A.W. "Auditory response in rats exposed to 2450 MHz electromagnetic fields in a circularly polarized waveguide". *Bioelectromagnetics*, 6:323-326. 1985
- Creagh E.M., Carmody R.J., Cotter T.G. "Heatshock protein 70 inhibits caspase-dependent and - independent apoptosis in Jurkat T cells". *Exp Cell Res.* 257: 58–66. 2000.
- D'Andrea J.A., Emmerson R.Y., Bailey C.M., Olsen R.G., Gandhi O.P. "Microwave radiation absorption in the rat: frequency-dependent SAR distribution in body and tail". *Bioelectromagnetics*, 6:199-206. 1985
- D'Souza S.M., Brown I.A. "Constitutive expression of heat shock proteins Hsp90, Hsc70, Hsp70 and Hsp60 in neuronal and non-

- neuronal tissues of rat during postnatal development". *Cell Stress & Chaperones*. 3: 188-189. 1998.
- Dabrowski M.P., Stankiewicz W., Sobiczewska E., Szmigielski S. "Immunotropic effects of electromagnetic fields in the range of radio- and microwave frequencies". *Pol Merkur Lekarski*. 11: 447-451. 2001.
- Dallmann R., Steinlechner S., von Hörsten S., Karl T. "Stressinduced hyperthermia in the rat: comparison of classical and novel recording methods". *Lab. Anim.*; 40:186-193. 2006.
- Dasdag S., Akdag M.Z., Ulukaya E., Uzunlar A.K., Yegin D., "Mobile phone exposure does not induce apoptosis on spermatogenesis in rats," *Arch. Med. Res.*, 1:40-44, 2007.
- Dasdag S., Akdag M.Z., Ulukaya E., Uzunlar A.K., Ocak A.R. "Effect of mobile phone exposure on apoptotic glial cells and status of oxidative stress in rat brain". *Electromagn Biol. Med.*, 28: 342-354. 2009.
- Daus A.W., Goldhammer M., Layer P.G., Thielemann C. "Electromagnetic exposure of scaffold-free three-dimensional cell culture systems." *Bioelectromagnetics*. 32: 351-359. 2011
- Davies S.A., Stewart E.J., Huesmaan G.R., Skaer, N.J. "Neuropeptide stimulation of the nitric oxide signalling pathway in *Drosophila melanogaster* Malpighian tubules". *Am. J. Physiol.*; 273: 823-827. 1997.
- Dawe A.S., Smith B., Thomas D.W., Greedy S., Vasic N., Gregory A., Loader B., de Pomerai D.I. "A small temperature rise may contribute towards the apparent induction by microwaves of heat-shock gene expression in the nematode *Caenorhabditis Elegans*". *Bioelectromagnetics*, 27: 88-97. 2006
- de Felipe I., Redondo P. "Animal model to explain fat atrophy using non ablative radiofrequency". *Dermatol Surg.*, 33: 141-5. 2007.
- de la Rosa E J., Vega-Nunez E., Morales A.V., Serna J., Rubio E., de Pablo F. Modulation of the chaperone heat shock cognate 70 by embryonic (pro) insulin correlates with prevention of apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998.
- Denaro V., Cittadini A., Barnaba S.A., Ruzzini L., Denaro L., Rettino A., De Paola B., Papapietro N., Sgambato A. "Static electromagnetic fields generated by corrosion currents inhibit

- human osteoblast differentiation". *Spine (Phila Pa 1976)*, 33:955-959. 2008.
- de Pomerai D., Daniells C., David H., Allan J., Duce I., Mutwakil M., Thomas D., Sewell P., Tattersall J., Jones D., Candido P. "Microwave radiation induces a heat-shock response and enhances growth in the nematode *Caenorhabditis elegans*". *IEEE Trans Microwave Theor Tech*, 48: 2076-2081. 2000.
- Diem E., Schwarz C., Adlkofer F., Jahn O., Rudiger H. "Non-thermal DNA breakage by mobile-phone radiation (1800 MHz) in human fibroblasts and in transformed GFSH-R17 rat granulosa cells in vitro". *Mutat. Res.*, 583: 178–183. 2005.
- Dimbylow P.J. y Mann S. M. "SAR calculations in an anatomically realistic model of the head for mobile communication transceivers at 900 MHz and 1.8 GHz". *Phys. Med. Biol.*, 39: 1537. 1994.
- DIRECTIVA 2004/40/CE. "Sobre las disposiciones mínimas de seguridad y de salud relativas a la exposición de los trabajadores a los riesgos derivados de los agentes físicos (campos electromagnéticos)". 2004.
- Dobrachinski F., Hinerasky da Silva M., Cardias Tassi C.L., Rodrigues de Carvalho N., Mundstock Dias G.R., Medeiros Golombieski R., da Silva Loreto E.L., da Rocha J.B., Figuera M.R., Soares F.A. "Neuroprotective Effect of Diphenyl Diselenide in an Experimental Stroke Model: Maintenance of Redox System in Mitochondria of Brain Regions". *Neurotox Res.*, 26: 317-330. 2014.
- Dong Y., Poellinger L., Gustafsson J.A., Okret S. "Regulation of glucocorticoid receptor expression: evidence for transcriptional and posttranslational mechanisms". *Mol Endocrinol.*, 2: 1256-64. 1988.
- Dutta S. K., Subramanian A , Ghosh B , Parshad R. "Microwave radiation-induced calcium efflux from brain tissue in vitro". *Bioelectromagnetics*, 5: 71-78. 1984.
- Eberhardt J.L., Persson B.R., Brun A.E., Salford L.G., Malmgren L.O. "Blood-brain barrier permeability and nerve cell damage in rat brain 14 and 28 days after exposure to microwaves from GSM mobile phones". *Electromagn Biol Med.*, 27: 215-29. 2008.
- Ebert S., Eom S. J., Schuderer J., Spostel U., Tillmann T., Dasenbrock C., and Kuster N., "Response, thermal regulatory threshold of

- restrained RFexposed mice at 905 MHz,” *Phys. Med. Biol.* 50: 5203–5215, 2005.
- Ebru G., Kristina W., Donald K.M., Stella M.V. “An in vitro study of the effects of exposure to a GSM signal in two human cell lines: Monocytic U937 and neuroblastoma SK-N-SH”. *Cell Biol Int* 30:793-799. 2006.
- El-Ezabi M.M. “Assessment of DNA Sensitivity and Heat Stress Protein Response (HSP70) in Male Wistar Rat Blood After Exposure to Microwave Radiation”. *Am J Sci*, 6: 218-225. 2010.
- Erkut A., Tumkaya L., Balik M.S., Kalkan Y., Guvercin Y., Yilmaz A., Yuce S., Cure E., Schitoglu I. “The effect of prenatal exposure to 1800 MHz electromagnetic field on calcineurin and bone development in rats”. *Acta Cir Bras* 31:74-83. 2016.
- Falzone N., Huyser C., Franken D.R., Leszczynski D. “Mobile phone radiation does not induce pro-apoptosis effects in human spermatozoa”. *Radiat Res*, 174: 169-76. 2010.
- Feder J.H., Rossi J.M., Solomon J., Solomon N., Lindquist S. “The consequences of expressing HSP70 in Drosophila cells at normal temperatures”. *Genes & Development*, 6: 1402-1413. 1992.
- Ferri F., Curcio G., Pasqueletti P., Gennaro L., Tech R.F., Rossi P.M. “Mobile phone emissions and human brain excitability”. *Ann Neurol.*, 60: 188-196. 2006.
- Filipovic D., Gavrilovic L., Dronjak S., Demajo M., Radojijc M.B. “Liver Glucocorticoid Receptor and Heat Shock Protein 70 Levels in Rats Exposed to Different Stress Models *Physiol*”. *Res.*, 57: 205-213. 2008.
- French P.W., Penny R., Laurence J.A., McKenzie D.R. “Mobile phones, heat shock proteins and cancer”. *Differentiation*, 67: 93-97. 2001.
- Frey A.H. “On the nature of electromagnetic field interactions with biological systems”. Austin:R.G.Landes Co. 1994.
- Fritze K., Sommer C., Schmitz B., Mies G., Hossmann K.A., Kiessling M., Wiessner C. “Effect of global system for mobile communication (GSM) microwave exposure on blood-brain barrier permeability in rat”. *Acta Neuropathol.* 94:465-470. 1997.
- Fuller K.J., Issels R.D., Slosman D.O., Guillet J.G., Soussi T., Polla B.S. “Cancer and the heat shock response”. *European Journal of Cancer.* 30: 1884-1891. 1994.

- Gass P., Schroder H., Prior P., Kiessling M. "Constitutive expression of heat shock protein 90 (HSP90) in neurons of the rat brain". *Neurosci. Lett.*, 183: 188-192. 1994.
- Genc O., Bayrak M., Yaldiz E. "Analysis of the effects of GSM bands to the electromagnetic pollution in the RF spectrum". *PIER*, Vol. 101: 17-32. 2010.
- Genuis S.J. "Field a current idea: exploring the public health impact of electromagnetic radiation". *Public Health*, 122: 113-124. 2008.
- Gandhi O.P., Li Q.X., Kang G. "Temperature rise for the human head for cellular telephones and for peak SARs prescribed in safety guidelines". *IEEE Trans Microwave Theory Tech*, 49: 1607-1613. 2001.
- Genuis S.J., Lipp C.T. Electromagnetic hypersensitivity: fact or fiction?" *Sci Total Environ*; 414:103–112. 2012.
- Ghavami S., Hashemi M., Ande S.R., Yeganeh B., Xiao W., Eshraghi M., Bus C.J., Kadkhoda K., Wiechec E., Halayko A.J., Los M. "Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes". *J Med Genet*, 46: 497–510. 2009.
- Giffard R.G. , Xu L., Zhao H., Carrico W., Ouyang Y., Qiao Y., Sapolsky R., Steinberg G., Hu B., Yenari M.A. "Chaperones, protein aggregation, and brain protection from hypoxic/ ischemic injury". *J Exp Biol* , 207: 3213-3322. 2004.
- Glushkova O.V., Khrenov M.O., Novoselova T.V., Lunin S.M., Parfenyuk S.B., Alekseev S.I., Fesenko E.E., Novoselova E.G. "The role of the NF- $\kappa$ B, SAPK/JNK, and TLR4 signalling pathways in the responses of RAW 264.7 cells to extremely low-intensity microwave". *Int J Radiat Biol*. 91:321-328. 2015.
- Golbach L.A., Scheer M.H., Cuppen J.J., Savelkoul H., Verburg-van Kemenade B.M. "Low-Frequency Electromagnetic Field Exposure Enhances Extracellular Trap Formation by Human Neutrophils through the NADPH Pathway". *J Innate Immun.*, 7:459-465. 2015.
- González D., Espino, J., Bejarano, I., López, J.J., Rodríguez, A.B., Pariente, J.A. "Caspase-3 and -9 are activated in human myeloid HL-60 cells by calcium signal". *Mol Cell Biochem*, 333: 151-157. 2010.
- González D., Rodríguez, A.B., Pariente, J.A. "TNF- $\alpha$ -induced apoptosis in human myeloid cell lines HL-60 and K562 is

- dependent of intracellular ROS generation". *Mol Cell Biochem*, 390: 281-287. 2014. A.
- González D., De Nicola, M., Bruni, E., Caputo, F., Rodríguez, A.B., Pariente, J.A., Ghibelli, L. "Nanoceria protects from alterations in oxidative metabolism and calcium overloads induced by TNF $\alpha$  and cycloheximide in U937 cells: pharmacological potential of nanoparticles". *Mol Cell Biochem* 397: 245-253. 2014. b.
- Gotoh T., Terada K., Oyadomari S., Mori M. "Hsp70-DnaJ chaperone pair prevents nitric oxide and CHOP-induced apoptosis by inhibiting translocation of Bax to mitochondria". *Cell Death Differ*, 11: 390-402. 2004.
- Gottwald E., Sontag W., Lahni B., Weibezahn K.F. "Expression of HSP72 after ELF-EMF exposure in three cell lines". *Bioelectromagnetics*, 28:509–518. 2007.
- Grand I., Picard D. "The glucocorticoid response are shaped by molecular chaperones". *Mol Cell Endocrinol*, 275: 2-12. 2007.
- Green S.J., Scheller L.F., Marletta M.A., Seguin M.C., Klotz F.W., Slayter M., Nelson B.J., Nacy C.A. "Nitric oxide: cytokine-regulation of nitric oxide in host resistance to intracellular pathogens". *Immunol. Lett.*, 43: 87–94. 1994.
- Gu Q., Yang X., Lin L., Li S., Li Q., Zhong S., Peng J., Cui Z. "Genetic ablation of solute carrier family 7a3a leads to hepatic steatosis in zebrafish during fasting". *Hepatology*, 60:1929-1941. 2014.
- Guibelalde E. "Protección ante exposición ocupacional a radiaciones no ionizantes: presente y futuro". *Radioproteccion*, 71: 11-16. 2012.
- Guristik E., Warton K., Martin D.K., Valenzuela S.M. An in vitro study of the effects of exposure to a GSM signal in two human cell lines: monocytic U937 and neuroblastoma SK-N-SH." *Cell Biol Int*. 30:793-799. 2006
- Guy, A.W., Lin, J.C., Kramar, P.O., Emery, A.F. "Effect of 2450-MHz radiation on the rabbit eye. *IEEE Trans*". *Microwave Theory Tech.*, 23: 492. 1975.
- Haimovitz-Friedman A., Kan C.C., Ehleiter D., Persaud R.S., McLoughlin M., Fuks Z., Kolesnick R.N. "Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis". *J. Exp. Med.*, 180: 525-35. 1994.
- Hae-June Lee, Young-Bae Jin, Jae-Seon Lee, Jeong-Ki Pack, Nam Kim, Yun-Sil Lee. One Year Simultaneous Combined Exposure of



- CDMA and WCDMA Radiofrequency Electromagnetic Fields to Rats. 2010
- Hae-June Lee, Yeung Bae Jin, Jae-Seon Lee, SooYong Choi, Tae-Hong Kim, Jeong-Ki Pack, HyungDoChoi, Nam Kim, and Yun-Sil Lee. "Lymphoma Development of Simultaneously Combined Exposure to Two Radiofrequency Signals in AKR/JMice". *Bioelectromagnetics*, 32:485-492. 2011.
- Hae-June Lee, Yeung Bae Jin, Tae-Hong Kim, Jeong-Ki Pack, Nam Kim, Hyung-Do Choi, Jae-Seon Lee, Yun-Sil Lee. "The Effectsof SimultaneousCombined Exposureto CDMAandWCDMA Electromagnetic FieldsonRat Testicular Function" *Bioelectromagnetics*. 2011.
- Hannun Y.A. "Sphingolipid second messengers: tumor suppressor lipids". *Adv Exp Med Biol.*, 400: 305-312. 1997.
- Hardas S., Sultana R., Warriar G., Dan Mo, Florence R.L., Wu P., Grulke E.A., Tseng M.T., Unrine J.M., Graham U.M., Yokel R.A., Butterfield D.A. "Rat brain pro-oxidant effects of peripherally administered 5 nm ceria 30 days after exposure". *NeuroToxicology*, 33: 1147-1155. 2012.
- Hardell L., Sage C. "Biological effects from electromagnetic field exposure and public exposure standards" *Biomed Pharmacother*, 104-109. 2008.
- Hardell L., Carlberg M., Söderquist F., Hansson Mildk. "Casecontrol study of the association between malignant brain tumors diagnosed between 2007 and 2009 and mobile and cordless phone use". *Int J Oncol.*, 43: 1833-1845. 2013.
- Hartl D.L., Clark A.G. "Principles of population genetics". Sinauer Associates, Inc. Sunderland, 565. 2007.
- He G.L., Liu Y., Li M., Chen C.H., Gao P., Yu Z.P., Yang X.S. "The amelioration of phagocytic ability in microglial cells by curcumin through the inhibition of EMF-induced pro-inflammatory responses". *J Neuroinflamm*, 19:11:49. 2014.
- Heikkinen P., Kosma V.M., Hongisto T., Huuskonen H., Hyysalo P., Komulainen H., Kumlin T., Lahtinen T., Lang S., Puranen L., Juutilainen J. "Effects of mobile phone radiation on X-ray-induced tumorigenesis in mice". *Radiat Res* 156:775-785. 2001.

- Helga T., Waltraud N. Hamid M.D. "In vitro Effects of GSM modulated Radiofrequency Fields on Human Immune Cells". *Bioelectromagnetics*, 27:188-196. 2006.
- Henriques Jr F.C., "Studies of thermal injury, the predictability and the significance of thermally induced rate process leading to irreversible epidermal injury," *Arch. Pathol.*, 43: 489–502, 1947.
- Hisidosglu E., Kantar Gok D., Er H., Akpinar D., Uysal F., Akkoyunlu G., Ozen S., Agar A., Yargicoglu P. "2100-MHz electromagnetic fields have different effects on visual evoked potentials and oxidant/antioxidant status depending on exposure duration". *Brain Res* 1635:1-11. 2016.
- Higashikubo R., Culbreth V.O., Spitz D.R., LaRegina M.C., Pickard W.F., Straube W.L., Moros E.G., Roti J.L.. "Radiofrequency electromagnetic fields have no effect of the in vivo proliferation of the 9L brain tumor". *Radiat Res* 665-671. 1999
- Hinrikus H., Bachmann M., Lass J. "Parametric mechanism of excitation of the electroencephalographic rhythms by modulated microwave radiation". *J Int J Radiat Biol.*, 87: 1077-1085. 2011.
- Hirata A, Kojima M, Kawai H, Yamashiro Y, Watanabe S, Sasaki H, Fujiwara O. Acute dosimetry and estimation of threshold-inducing behavioral signs of thermal stress in rabbits at 2.45-GHz microwave exposure. *IEEETrans. Biomed. Eng.* 2010; 57:1234-1242.
- Hirose H., Sasaki A., Ishii N., Sekijima M., Iyama T., Nojima T., Ugawa Y. "1950 MHz IMT-2000 field does not activate microglial cells in vitro". *Bioelectromagnetics* 31:104-112. 2010.
- Hirvonen M.R., Brüne B., Lapetina E.G. "Heat shock proteins and macrophage resistance to the toxic effects of nitric oxide". *Biochem J*, 315:845-849. 1996.
- Hou, Y.C.; Janczuk, A.; Wang, P.G. "Current trends in the development of nitric oxide donors". *Curr. Pharm. Des.*, 5: 417–471. 1999.
- Huber R., Treyer V., Borbély A.A., Schuderer J., Gottselig J.M., Landolt H.P., Werth E., Berthold T., Kuster N., Buck A., Achermann P. "Electromagnetic fields, such as those from mobile phones, alter regional cerebral blood flow and sleep and waking EEG". *J Sleep Res.*, 11: 289-295. 2002.
- Huber R., Treyer V., Schuderer J., Berthold T., Buck A., Kuster N., Landolt H.P., Achermann P. "Exposure to pulsemulated radio



- frequency electromagnetic fields affects regional cerebral blood flow". *Eur J Neurosci.*, 21: 1000-1006. 2005.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). "Non-ionizing radiation, part 1: static and extremely low-frequency (ELF) electric and magnetic fields". 2002.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). "Non-ionizing radiation, part 2: radiofrequency electromagnetic fields". 2013
- ICNIRP (International Commission on Non-ionizing Radiation Protection). "Recomendaciones para limitar la exposición a campos eléctricos, magnéticos y electromagnéticos (hasta 300 GHz). [www.icnirp.org](http://www.icnirp.org). 1996.
- ICNIRP (International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection) "Recomendaciones para limitar la exposición a campos eléctricos, magnéticos y electromagnéticos (hasta 300 GHz)." *Health Phys.*, 74: 494–522, 1998.
- ICNIRP (International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection) "statement on the Guidelines for limiting exposure to time-varying electric, magnetic, and electromagnetic fields (up to 300 GHz). *Health Phys.*, 97: 257-258. 2009.
- Ignacio G.O., Pablo G.O., Francisco G.C., Encarna C. and Luis L.M. "Pulsed electromagnetic fields decrease proinflammatory cytokine secretion (IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ ) on human fibroblast-like cell culture". *Rheumatol Int.*, 31:1283–1289. 2011.
- Ikeda K., Shinmura Y., Mizoe H., Yoshizawa H. Yoshida A., Kanao S., Sumitani H., Hasebe S., Motomura T., Yamakawa T., Mizuno F., Otaka Y., Hirose H. No effects of extremely low frequency magnetic fields found on cytotoxic activities and cytokine production of human peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Bioelectromagnetics* 24:21-31. 2003.
- Irmak M.K., Fadillioğlu E., Güleç M., Erdoğan H., Yağmurca M., Akyol O. "Effects of electromagnetic radiation from a cellular telephone on the oxidant and antioxidant levels in rabbits Cell". *Biochemical Function*, 20:279–283. 2002.
- Jaattela M. "Over-expression of HSP70 confers tumorigenicity to mouse fibrosarcoma cells". *Int J Cancer*, 60: 689-693. 1995.
- Jan Zhao T.Y., Zou S.P., Knapp P.E.". Exposure to cell phone radiation up-regulates apoptosis genes in primary cultures of neurons and astrocytes." *Neurosci Lett.*, 412: 34-38. 2006.

- Jeon S.G., Sang Wook Park, Dong Woon Kim, Je Hoon Seo, Jaeyoung Cho, So Young Lim, Seong Deok Kim. "Glial expression of the 90-kDa heat shock protein (HSP-90) and the 94-kDa Glucose-regulated protein (GRP94) following an excitotoxic lesion in the mouse hippocampus". *Glia.*, 48: 250-258. 2004.
- Jordan, J. «Apoptosis: muerte celular programada». Centro Regional de Investigaciones Biomédicas, (2003).
- Jin P.Y., Woo Jo Y., Bang S.I., Kim H.J., Lim S.Y., Mun G.H., Hyon W.S. "Radio frequency volumetric reduction for masseteric hypertrophy". *Aesthetic Plast Surg*, 31: 42-52. 2007.
- Jin Y.B., Lee H.J., Seon Lee J., Pack J.K., Kim N., Lee Y.S. "One-year, simultaneous combined exposure of CDMA and WCDMA radiofrequency electromagnetic fields to rats". *Int. J. Radiat. Biol.*, 87:416-423. 2011.
- Jin Y.B., Pyun BJ, Jin H, Choi HD, Pack JK, Kim N, Lee YS. "Effects of simultaneous combined exposure to CDMA and WCDMA electromagnetic field on immune functions in rats". *Int. J. Radiat. Biol.*, 88:814-821.2012.
- Jin Y.B., Choi H.D., Kim B.C., Pack J.K., Kim N., Lee Y.S. "Effects of simultaneous combined exposure to CDMA and WCDMA electromagnetic fields on serum hormone levels in rats". *J Radiat Res.*, 54:430-437. 2013.
- Johansson A., Forsgren S., Stenberg B., Wilén J., Kalezić N., and Sandström M. "No effect of mobile phone-like RF exposure on patients with atopic dermatitis". *Bioelectromagnetics* 29:353-362. 2008.
- Jorge-Mora T., Alvarez Folgueiras M., Leiro-Vidal J. M., Jorge-Barreiro F. J., Ares-Pena F. J., and López-Martin E. "Exposure to 2.45GHz microwave radiation provokes cerebral changes in induction of HSP-90  $\alpha/\beta$  heat shock protein in rat". *PIER*, 100: 351-379. 2010.
- Jorge-Mora T., Misa-Agustino M.J., Rodríguez-González J.A., Jorge-Barreiro F.J., Ares-Pena F.J., López-Martín E. "The effects of single and repeated exposure to 2.45 GHz radiofrequency fields on c-Fos protein expression in the paraventricular nucleus of rat hypothalamus". *Neurochem Res.*, 36: 2322-32. 2011.
- Joubert V., Bourthoumieu S., Leveque P., Yardin C. "Apoptosis is induced by radio frequency fields through the caspase-independent

- mitochondrial pathway in cortical neurons". *Radiat Res*, 169: 38-45. 2008.
- Juutilainen J., Matilainen P., Saarikoski S., Läärä E., Suonio S. "Early pregnancy loss and exposure to 50-Hz magnetic fields". *Bioelectromagnetics*, 14: 229-236. 1993.
- Juutilainen J., Hoyto A., Kumlin T., Naarala J. "Review of Possible Modulation-Dependent Biological Effects of Radiofrequency Fields". *Bioelectromagnetics*, 32: 511-534. 2011.
- Kang K.A., Lee H.C., Lee J.J., Hong M.N., Park M.J., Lee Y.S., Choi H.D., Kim N., Ko Y.G., Lee J.S. "Effects of combined radiofrequency radiation exposure on levels of reactive oxygen species in neuronal cells". *J. Radiat. Res.*, 55:265-276. 2014.
- Kang K.I., Bouhouche I., Fortin D., Baulieu E.E., Catelli M.G. "Luciferase activity and synthesis of Hsp70 and Hsp90 are insensitive to 50Hz electromagnetic fields". *Life Sci.*, 63:489-97. 1998.
- Karolina W.P., Jolanta K.Z., Eugeniusz R., Piotr T., Paulina C., Józef M. "Influence of static and alternating magnetic fields on u937 cell viability". *Folia Medica Cracoviensia* 4:21–33. 2014.
- Kesari K.K., Kumar S., Behari J. "MHz microwave radiation promotes oxidation in rat brain. 900-MHz microwave radiation promotes oxidation in rat brain". *Electromagn Biol Med.*, 30: 219-234. 2011.
- Kim H.N., Han N.K., Hong M.N., Chi S.G., Lee Y.S., Kim T., Pack J.K., Choi H.D., Kim N., Lee J.S. "Analysis of the cellular stress response in MCF10A cells exposed to combined radio frequency radiation". *J Radiat Res*, 53:176-83. 2012.
- Kim J.H., Yu D.H., Kim H.J., Huh Y.H., Cho S.W., Lee J.K., Kim H.G., Kim H.R. "Exposure to 835 MHz radiofrequency electromagnetic field induces autophagy in hippocampus but not in brain stem of mice". *Toxicol Ind Health*, 34:23-35. 2018.
- Kim S.J., Jang Y.W., Hyung K.E., Lee D.K., Hyun K.H., Jeong S.H., Min K.H., Kang W., Jeong J.H., Park S.Y., Hwang K.W. "Extremely low-frequency electromagnetic field exposure enhances inflammatory response and inhibits effect of antioxidant in RAW 264.7 cells." *Bioelectromagnetics*. 38: 374-385. 2017.
- Kim T.H., Huang T.Q., Jang J.J., Kim M.H., Kim H.J., Lee J.S., Pack J.K. "Local exposure of 849 MHz and 1763 MHz radio frequency

- radiation to mouse heads does not induce cell death or cell proliferation in brain". *Exp Mol Med.*, 40: 294-303. 2008.
- Kim Y.J., Kim J.Y., Ko A.R., Kang T.C. "Reduction in Heat shock protein 90 correlates to neuronal vulnerability in the rat piriform cortex following status epilepticus". *Neuroscience*, 255: 265-277. 2013.
- Kirschke E., Goswami D., Southworth D., Griffin P.R., Agard D.A. "Glucocorticoid receptor function regulated by coordinated action of the Hsp90 and Hsp70 chaperone cycles". *Cell*, 157: 1685-97. 2014.
- Kolomyitseva M.P., Gapeev A.B., Sadovnikov V.B., Chemeris N.K. "Suppression of nonspecific resistance of the body under the effect of extremely high frequency electromagnetic radiation of low
- Koyama S., Narita E., Suzuki Y., Taki M., Shinohara N. Miyakoshi J. "Effect of a 2.45-GHz radiofrequency electromagnetic field on neutrophil chemotaxis and phagocytosis in differentiated human HL-60 cells". *J Radiat Res*, 56:30-36. 2015.
- Kregel K. "Molecular Biology of Thermoregulation Invited Review: Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance". *J Appl Physiol.* 92:2177–2186. 2002.
- Kunz K.S., Luebbers R.J. "The finite difference time domain method for electromagnetics". CRC Press, Inc; Boca Raton Florida. (1993)
- Lai H., Horita A., Chou C.K., Guy A.W. "Low-level microwave irradiations affect central cholinergic activity in the rat". *J Neurochem*, 48: 40-45. 1987.
- Lai H., Carino M.A., Horita A., Guy A.W. "Low-level microwave irradiation and central cholinergic systems". *Pharmacol Biochem Behav*, 33: 131-138. 1989.
- Lai H., Carino M.A., Horita A., Guy A.W. "Low-level microwave irradiation and central cholinergic activity: a dose-response study". *Bioelectromagnetics*. 10: 203-208. 1989.
- Lai H., Carino M.A., Horita A., Guy A.W. "Corticotropin-releasing factor antagonist blocks microwave-induced decreases in high-affinity choline uptake in the rat brain". *Brain Res Bull*, 25: 609-612. 1990.

- Lai H., Carino M.A., Wen Y.F., Horita A., Guy A.W. "Naltrexone pretreatment blocks microwave-induced changes in central cholinergic receptors". *Bioelectromagnetics*, 12: 27-33. 1991.
- Lai H., Horita A., Guy A.W. "Microwave irradiation affects radial-arm maze performance in the rat". *Bioelectromagnetics*, 15: 95-104. 1994.
- Lee H.J., Lee J.S., Pack J.K., Choi H.D., Kim N., Kim S.H., Lee Y.S., "Lack of teratogenicity after combined exposure of pregnant mice to CDMA and WCDMA radio frequencyelectromagnetic fields". *Radiat Res*, 172: 648-52. 2009.
- Lee H.J., Pack J.K., Kim T.H., Kim N., Choi S.Y., Lee J.S., Kim S.H., Lee Y.S. "The lack of histological changes of CDMA cellular phone-based radio frequency on rat testis". *Bioelectromagnetics*, 31: 528-534. 2010.
- Lee H.J., Jin Y.B., Lee J.S., Choi S.Y., Kim T.H., Pack J.K., Choi H.D., Kim N., Lee Y.S. "Lymphoma development of simultaneously combined exposure to two radio frequencysignals in AKR/J mice". *Bioelectromagnetics*, 32: 485-492. 2011.
- Lee H.J., Jin Y.B., Kim T.H., Pack J.K., Kim N., Choi H.D., Lee J.S., Lee Y.S. "The Effects of Simultaneous Combined Exposure to CDMA and WCDMA Electromagnetic Fields on Rat Testicular Function". *Bioelectromagnetics*, 2012.
- Liling S., Xiaoxia W., Zhengping X., Guangdi C. "RF-EMF exposure at 1800MHz did not elicit DNA damage or abnormal cellular behaviors in different neurogenic cells". *Bioelectromagnetics* 38:175-185. 2017.
- Lin H.Y., Lin Y.J. "In vitro effects of low frequency electromagnetic fields on osteoblast proliferation and maturation in an inflammatory environment". *Bioelectromagnetics*, 32:552-560. 2011.
- López-Furelos A., Miñana-Maiques M.M, Leiro J.M., Rodríguez-González J.A., Ares-Pena F.J., López-Martín E. "An experimental multi-frequency system for studying dosimetry and acute effects on cell and nuclear morphology in rat tissues". *PIER*, 129:541-558. 2012.
- López-Furelos A., Leiro-Vidal J.M., Salas-Sánchez A.Á., Ares-Pena F.J., López-Martín M.E. "Evidence of cellular stress and caspase-3 resulting from a combined two-frequency signal in the cerebrum

- and cerebellum of sprague-dawley rats". *Oncotarget*, 7:64674-64689. 2016.
- López-Furelos A, Salas-Sánchez AA, Ares-Pena FJ, Leiro-Vidal JM, López-Martín "Exposure to radiation from single or combined radio frequencies provokes macrophage dysfunction in the RAW 264.7 cell line". *Int J Radiat Biol.*, 30, pp. 1-12. 2018
- López-Martín E., Relova-Quinteiro J.L., Gallego-Gómez R., Peleteiro-Fernández M., Jorge-Barreiro F.J., Ares-Pena F.J. "GSM radiation triggers seizures and increases cerebral c-Fos positivity in rats pretreated with subconvulsive doses of picrotoxin". *Neurosci Lett*, 398: 139-144. 2006.
- López-Martín, E., Bregains J.C., Jorge-Barreiro F.J., Sebastián-Franco J.L., Moreno-Piquero E., Ares- Pena F. "An experimental set-up for measurement of the power absorbed from 900MHz GSM standing waves by small animals, illustrated by application to picrotoxin treated rats". *PIER*, 87:149-165. 2008.
- López-Martín E, Bregains J, Relova-Quinteiro JL, Cadarso-Suárez C, Jorge-Barreiro FJ, Ares-Pena FJ. "The action of pulse-modulated GSM radiation increases regional changes in brain activity and c-Fos expression in cortical and subcortical areas in a rat model of picrotoxin-induced seizure proneness." *J Neurosci Res*, 87: 1484-1499. 2009
- López-Martín E., Salas-Sanchez A.A., López-Furelos A., Jorge-Barreiro F., Moreno-Piquero E., Ares-Pena F. "The calculation of dosimetry in small animals combining the FDTD method and experimental measures: application for three radiation systems" *Waste and Waste Management. Nova*. 127-146. 2017.
- Lozano G.M., Bejarano, I., Espino, J., González, D., Ortiz, A., García, J.F., Rodríguez, A.B., Pariente, J.A. "Relationship between Caspase Activity and Apoptotic Markers in Human Sperm in Reponse to Hydrogem Peroxide and Progesterone". *J Reprod Dev*, 55: 615-621. 2009.
- Lu Y., He M., Zhang Y., Xu S., Zhang L., He Y., Chen C., Liu C., Pi H., Yu Z., Zhou Z. "Differential pro-inflammatory responses of astrocytes and microglia involve STAT3 activation in response to 1800 MHz radiofrequency fields". *PLoS One*, 9:e108318. 2014.
- Lushnikov K.V., Gapeev A.B., Sadovniko V.B., Cheremis N.K. "Effect of extremely high frequency electromagnetic radiation of



- low intensity on parameters of humoral immunity in healthy mice". *Biofizika*, 46: 753-760. 2001.
- Mailankot M., Kunnath A.P., Jayalekshmi H., Koduru B., Valsalan R. "Radio frequency electromagnetic radiation (RF-EMR) from GSM (0.9/1.8GHz) mobile phones induces oxidative stress and reduces sperm motility in rats". *Clinics*, 64: 561-565. 2009.
- Mailhos C., Howard M.K., Latchman D.S. "Heat Shock protects neural cells from programmed cell death by apoptosis". *Neuroscience*, 55: 621-627. 1993.
- Makar V.R., Logani M.K., Bhanushali A., Alekseev S.I. Ziskin M.C. "Effect of cyclophosphamide and 61.22 GHz millimeter waves on T-cell, B-cell, and macrophage functions". *Bioelectromagnetics* 27:458-466. 2006.
- Maresuke N., Aya N., Tsuyoshi H., Hidetake M. "Evaluation of cell viability, DNA single-strand breaks, and nitric oxide production in LPS-stimulated macrophage RAW264 exposed to a 50-Hz magnetic field". *Int J Radiat Biol*, 92:583-589. 2016.
- María Julia M.R., Pérez López M., Mercedes C.G., José-Luis P.V., Jesús-Juan C.A., María del Mar Y.F., Isabel B.P., Juan V.P., Yolanda Mercedes C.P., Diego Fernando L.N. "Bienestar animal. Métodos de eutanasia y aturdimiento". Xunta de Galicia. 2015.
- Markkanen A., Penttinen P., Naarala J., Pelkonen J., Sihvonen A.P., Juutilaine J. "Apoptosis induced by ultraviolet radiation is enhanced by amplitude modulated radiofrequency radiation in mutant yeast cells". *Bioelectromagnetics*, 25:127-133, 2004.
- Martin L., Meltz. "Toxicity, Genotoxicity, and Transformation". *Bioelectromagnetics*, 6: 196-213. 2003.
- Mason P.A., Escarciga R., Doyle J.M., Romano W.F., Berger R.E., Donnellan J.P. "Amino acid concentrations in hypothalamic and caudate nuclei during microwaveinduced thermal stress: analysis by microdialysis". *Bioelectromagnetics*, 18:277-283. 1997.
- Mausset-Bonnefont A.L., Hirbec H., Bonnefont X., Privat A., Vignon J., de Sèze R. "Acute exposure to GSM 900-MHz electromagnetic fields induces glial reactivity and biochemical modifications in the rat brain". *Neurobiol Dis.*, 17: 445-454. 2004.
- Mayers C.P., Habeshaw J.A. "Depression of phagocytosis: A non-thermal effect of microwave radiation as a potential hazard to health". *Int J Radiat Biol*, 24:449-461. 1973.

- McNamee J.P., Chauhan V. "Radiofrequency radiation and gene/protein expression: a review". *Radiat Res.*, 72: 265-287. 2009.
- Megha K., Deshmukh P.S., Banerjee B.D., Tripathi A.K., Ahmed R., Abegaonkar M.P. "Low intensity microwave radiation induced oxidative stress, inflammatory response and DNA damage in rat brain". *Neurotoxicology* 51:158-165. 2015.
- Meltz M.L., "Radiofrequency exposure and mammalian cell toxicity, genotoxicity, and transformation". *Bioelectromagnetics*, 6:196-213. 2003.
- Meric A. Esmekaya, Cigdem O. and Nesrin S. "900 MHz pulse-modulated radiofrequency radiation induces oxidative stress on heart, lung, testis and liver tissues". *Gen Physiol Biophys* 30:84-89. 2011.
- Michaelson S.M. "Physiologic regulation in electromagnetic fields". *Bioelectromagnetics*, 3:91-103. 1982.
- Misa-Agustino M.J., Leiro J.M., Jorge-Mora M.T., Rodríguez-González J.A., Jorge-Barreiro F.J., Ares-Pena F.J., López-Martín E. "Electromagnetic fields at 2.45 GHz trigger changes in heat shock proteins 90 and 70 without altering apoptotic activity in rat thyroid gland". *Biology Open*, 1:831-838. 2012.
- Misa-Agustino M.J., Leiro-Vidal J.M., Gomez-Amoza J.L., Jorge-Mora M.T., Jorge-Barreiro F.J., Salas-Sánchez A.A., Ares-Pena F.J., López-Martín E. "EMF radiation at 2450 MHz triggers changes in the morphology and expression of heat shock proteins and glucocorticoid receptors in rat thymus". *Life Sci.*, 127:1-11. 2015.
- Mohsin S.K., Weiss H.L., Gutierrez M.C., Chamness G.C., Schiff R., Digiovanna M.P., Wang C.X., Hilsenbeck S.G., Osborne C.K., Allred D.C., Elledge R., Chang J.C. "Neoadjuvant trastuzumab induces apoptosis in primary breast cancers". *J Clin Oncol*, 23: 2460-2468. 2005.
- Moquet J., Ainsbury E., Bouffler S., Lloyd D. "Exposure to low level GSM 935 MHz radio frequency fields does not induce apoptosis in proliferating or differentiated murine neuroblastoma cells." *Radiat Prot Dosimetry.*, 131: 287-296. 2008.
- Morano K.A. "New tricks for an old dog: the evolving world of Hsp70". *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1113: 1-14. 2007.



- Mosser D.D., Caron A.W., Bourget L., DenisLarose C., Massie B. "Role of the human heat shock protein HSP70 in protection against stressinduces apoptosis". *Molecular and Celular Biolology*, 17: 5317-5327. 1997.
- Mungrue I.N., Husain M., Stewart D.J. "The role of NOS in heart failure: lessons from murine genetic models". *Heart Fail Rev.*, 7: 407–22. 2002.
- Neubauer C., Phelan A.M., Kues H., Lange D.G. "Microwave irradiation of rats at 2.45 GHz activates pinocytotic-like uptake of tracer by capillary endothelial cells of cerebral cortex". *Bioelectromagnetics*, 11: 261-8. 1990.
- Novoselova E.G., Glushkova O.V., Khrenov M.O., Parfenyuk S.B., Lunin S.M., Vinogradova E.V., Novoselova T.V., Fesenko E.E. "Involvement of the p38 MAPK signaling cascade in stress response of RAW 264.7 macrophages". *Dokl Biol Sci.*, 476:203-205. 2017.
- Ogata T., Oishi Y., Higashida K., Higuchi M., Muraoka I. "Prolonged exercise training induces long-term enhancement of HSP70 expression in rat plantaris muscle". *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 296: 1557-1563. 2009.
- Olgar Y., Hidisoglu E., Celen M.C., Yamasan B.E., Yargicoglu P., Ozdemir S. "2.1 GHz electromagnetic field does not change contractility and intracellular Ca<sup>2+</sup> transients but decreases  $\beta$ -adrenergic responsiveness through nitric oxide signaling in rat ventricular myocytes". *Int J Radiat Biol.*, 91:851-857. 2015.
- Oral B., Guney M., Ozguner F., Karahan N., Mungan T., Comlekci S., Cesur G. "Endometrial apoptosis induced by a 900-MHz mobile phone: preventive effects of vitamins E and C". *Adv Ther.*, 23: 957-73. 2006.
- Ouyang Y.B., Xu L.J., Sun Y.J., Giffard R.G. "Overexpression of inducible heat shock protein 70 and its mutants in astrocytes is associated with maintenance of mitochondrial physiology during glucose deprivation stress". *Cell Stress Chaperones*, 11: 180-186. 2006.
- Ouyang Y.B., Giffard R.G. "MicroRNAs regulate the chaperone network in cerebral ischemia". *Transl Stroke Res.*, 4: 693-703. 2013.

- Palumbo R., Brescia F., Capasso D., Sannino A., Sarti M., Capri M., Grassilli E., Scarfi M.R. "Exposure to 900 MHz radiofrequency radiation induces caspase 3 activation in proliferating human lymphocytes". *Radiat Res.*; 170(3):327-34. 2008.
- Pan Y.M., Sun H.L., Hu G.L., Xu Z.P., Jiang H., Sun W.J. "Noise magnetic fields mitigates the inhibition of secretion function of primary human villous trophoblasts induced by 50 Hz magnetic fields". *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 37:39-44. 2008.
- Panagopoulos D.J., Johansson O., Carlo G.L. "Evaluation of Specific Absorption Rate as a Dosimetric Quantity for Electromagnetic Fields Bioeffects". *Plos One*, 8,1-9. 2013.
- Paniagua, J.M., Montaña R., Jiménez A., Antolín A., Sánchez M., "Electrical stimulation vs thermal effects in a complex electromagnetic environment". *Sci Total Environ.* 407:4717-4722. 2009.
- Perentos N., Croft R.J., McKenzie R.J., Cvetkovic D., Cosic I. "Comparison of the effects of continuous and pulsed mobile phone like RF exposure on the human EEG". *Australas Phys Eng Sci Med.*, 30: 274-80. 2007.
- Pérez-Bruzón R.N., del Moral A., Pérez-Castejón C., Llorente M., Vera A. Azanza M.J. "Validation of an original incubator set-up for the exposure of human astrocyte cells to X-band microwaves in a GTEM-chamber". *Histol Histopathol* 26:1187-1196. 2011.
- Perry D.K., Smyth M.J., Stennicke H.R., Salvesen G.S., Duriez P., Poirier G.G., Hannun Y.A. "Zinc is a potent inhibitor of the apoptotic protease, caspase-3. A novel target for zinc in the inhibition of apoptosis". *J Biol Chem*, 272: 18530–18533. 1997.
- Petrini C., Dupuis M.L., Polichetti A., Ramoni C., Vecchia P. "Tumor necrosis factor  $\alpha$  and interferon  $\gamma$  production by human peripheral blood mononuclear cells exposed in vitro to sinusoidal 50 Hz magnetic fields". *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 44:121–125. 1997.
- Phelan A.M., Lange D.G., Kues H.A., Luty G.A. "Modification of membrane fluidity in melanin containing cells by low level microwave radiation". *Bioelectromagnetics*, 13: 131-146. 1992.
- Pilla A.A. "Electromagnetic fields instantaneously modulate nitric oxide signaling in challenged biological systems". *Biochem Biophys Res Commun.*, 426: 330-333. 2012

- Powers, M.V., Workman, P. "Inhibitors of the heat shock response: biology and pharmacology". FEBS Letter, 581: 3758-3769. 2007.
- Quaglini D., Capri M., Ronchetti I.P. "Modulation of cell death in the rat thymus. Light and electron microscopic investigations". Ann N Y Acad Sci., 926: 79-82. 2000.
- Quaglini D., Capri M., Zecca L., Franceschi C., Ronchetti I.P. "The effect on rat thymocytes of the simultaneous in vivo exposure to 50-Hz electric and magnetic field and to continuous light". ScientificWorldJournal., 4: 91-9. 2004.
- Radicheva N., Mileva K., Vukova T., Georgieva B., Kristev I. "Effect of microwave electromagnetic field on skeletal muscle fibre activity". Arch Physiol Biochem. 110: 203-14. 2002
- Rağbetli M.C., Aydinlioğlu A., Rağbetli N., Bektas C., Ozdemir S. "The effect of mobile phone on the number of Purkinje cells: a stereological study". Int J Radiat Biol., 86: 548-54. 2010.
- Ramaglia V., Buck L.T. "Time-dependent expression of heat shock proteins 70 and 90 in tissues of anoxic western painted turtle". J Exp Bio, 207: 3775-3784. 2004.
- Ramaglia V., Harapa G.M., White N., Buck L.T. "Bacterial infection and tissue specific Hsp72 73 and 90 expression in western painted turtles". Comp Biochem Physiol, 138: 139-148. 2004.
- REAL DECRETO 1066/2001, 28 de septiembre en el Boletín Oficial de Estado. 2001.
- Regel S.J., Tinguely G., Schuderer J., Adam M., Kuster N., Landolt H.P., Achermann P. "Pulsed radio-frequency electromagnetic fields: dose-dependent effects on sleep, the sleep EEG and cognitive performance". J Sleep Res., 16: 253-258. 2007.
- Regueiro-González J.R., López-Larrea C., González-Rodríguez S., Martínez-Naves E. "Inmunología, Biología y patología del sistema inmunitario". 4ª Ed. 2011.
- Repacholi M.H., Basten A., Gebiski V., Noonan D., Finni J., Harris A.W. "Lymphomas in E-Pim1 transgenic mice exposed to pulsed 900 MHz electromagnetic fields". Radiat Res, 147: 631-640. 1997.
- Reynolds P.R.L, Allen G.V. "A review of heat shock protein induction following cerebellar injury". Cerebellum, 2:171-177. 2003.
- Richter C. "Pro-oxidants and mitochondrial Ca, their relationship to apoptosis and oncogenesis". FEBBS Letts., 325: 104-107. 1993.

- Richter K., Haslbeck M., Buchner J. "The Heat Shock Response: Life on the Verge of Death". *Mol Cell.*, 40: 253-266. 2010.
- Ritossa F. "A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila". *Cell Mol Life Sci*, 18: 571-573. 1962.
- Ritossa F. "Discovery of the heat shock response". *Cell Stress Chaperones*, 1: 97-98. 1996.
- Roberta R.A., Mara A.B., Giuseppe P., Silvia D., Mario G., Pier G.P. "Increased Levels of Inducible HSP70 in Cells Exposed to Electromagnetic Fields". *Radiat Res* 165: 95-104. 2006.
- Rodina A., Vilenchik M., Moulik K., Aguirre J., Jim J., y col., "Selective compounds define Hsp90 as a major inhibitor of apoptosis in small-cell lung cancer". *Nat. Chem. Biol*, 3: 498-507. 2007.
- Sabirzhanov B., Stoica B.A., Hanscom M., Piao C.S., Faden A.I. "Over-expression of HSP70 attenuates caspase-dependent and caspase-independent pathways and inhibits neuronal apoptosis". *J Neurochem.*, 123: 542-554. 2012.
- Seaman R.L., Parker J.E., Kiel J.L., Mathur S.P., Grubbs T.R., Prol H.K. "Ultra-Wideband Pulses Increase Nitric Oxide Production by RAW 264.7 Macrophages Incubated in Nitrate". *Bioelectromagnetics* 23:83-87. 2002.
- Salford L.G., Brun A., Stureson K., Eberhardt J.L., Persson B.R.R. "Permeability of the blood-brain barrier induced by 915 MHz electromagnetic radiation, continuous wave and modulated at 8, 16, 50, 200Hz". *Microsc Res Tech*, 27: 535-542. 1994.
- Salvesen G.S. "Caspases: opening the boxes and interpreting the arrows". *Cell Death Differ*, 9: 3-5. 2002.
- Sandrine S., Hiroshi M., Gilles R., Florence P.D., Bernard B., Bernard V. "Effect of GSM-900 and -1800 signals on the skin of hairless rats. III: Expression of heat shock proteins". *Int J Radiat Biol* 84:61-68. 2008.
- Santoro M.G. "Heat shock factors and the control of the stress response". *Biochem Pharmacol*. 59: 55-63. 2000.
- Sangster T.A., Salathia N., Undurraga S., Milo R., Schellenberg K., Lindquist S., Queiysch C. "HSP90 Affects the expression of genetic variation and developmental stability in quantitative traits". *Proc Natl Acad Sci*, 105: 2963-2968. 2008.

- Sannino A., Zeni O., Sarti M., Romeo S., Reddy S.B., Belisario M.A., Prihoda T.J., Vijayalaxmi, Scarfi M.R. "Induction of adaptive response in human blood lymphocytes exposed to 900 MHz radiofrequency fields: influence of cell cycle". *Int J Radiat Biol.*; 87(9):993-999.2011.
- Santoro M.G. "Heat shock factors and the control of the stress response". *Biochem Pharmacol*, 59: 55-63. 2000.
- Sastre A., Cook M.R., Graham C. "Nocturnal exposure to intermittent 60 Hz magnetic fields alters human cardiac rhythm". *Bioelectromagnetics*, 19: 98-106. 1998.
- Saygin M., Caliskan S., Karahan N., Koyu A., Gumral N., Uguz N." Testicular apoptosis and histopathological changes induced by a 2.45 GHz electromagnetic field", *A. Toxicol Ind Health*,27: 455-63. 2011.
- Scarfi M.R., Freseghna A.M., Villani P., Pinto R., Marino C., Sarti M., Altavista P., Sannino A., Lovisolo G.A. "Exposure to radiofrequency radiation (900 MHz, GSM signal) does not affect micronucleus frequency and cell proliferation in human peripheral blood lymphocytes: an interlaboratory study". *Radiat Res.*, 165(6):655-663. 2006
- SCC39 (IEEE International Committee on Electromagnetic Safety). "IEEE Standard for Safety Levels with Respect to Human Exposure to Radio Frequency Electromagnetic Fields, 3 kHz to 300 GHz". 1-228. Approved 2005.
- Schmid & Partner Engineering AG. "Reference manual for the SEMCAD simulation platform for electromagnetic compatibility antenna desing and dosimetry" Available from <http://www.semcad.com>. 2009.
- Seaman R.L., Parker J.E., Kiel J.L., Mathur S.P., Grubbs T.R., Prol H.K. "Ultra-Wideband Pulses Increase Nitric Oxide Production by RAW 264.7 Macrophages Incubated in Nitrate". *Bioelectromagnetics*, 23:83-87. 2002.
- Sebastián Franco J.L., Muñoz San Martín S., Sancho Ruiz M., Miranda Pantoja J. M. "Medición de radiaciones en seres vivos". *Investigación y ciencia*, 353: 46-55. 2006.
- Sepehrimanesh M., Kazemipour N., Saeb M., Nazifi S., Davis D.L. "Proteomic analysis of continuous 900-MHz radiofrequency electromagnetic field exposure in testicular tissue: a rat model of

- human cell phone exposure". *Environ Sci Pollut Res Int.*, 24:13666-13673. 2017.
- Shirai T., Wang J., Kawabe M., Wake K., Watanabe S.I., Takahashi S., Fujiwara O. "No adverse effects detected for simultaneous whole-body exposure to multiple-frequency radiofrequency electromagnetic fields for rats in the intrauterine and pre- and post-weaning periods". *J. Radiat. Res.*, 58:48-58. 2017.
- Silke Thomas, Anja Kühnlein, Sabine Heinrich, Georg Praml, Dennis Nowak, Rüdiger von Kries, Katja Radon. "Personal exposure to mobile phone frequencies and well-being in adults: A cross-sectional study based on dosimetry Eur". *J Epidemiol.* 2009.
- Silke Thomas, Anja Kühnlein, Sabina Heinrich, George Pralm, Rudiger von Kries and Katja Radon. "Exposure to mobile telecommunication networks assessed using personal dosimetry and well-being in children and adolescents: the German Mobile-study". *Environ Health*, 1-12. 2008.
- Simkó M., Hartwig C., Lantow M., Lupke M., Mattsson M.O., Rollwitz J. "HSP70 expression and free radical release after exposure to non-thermal radio-frequency electromagnetic fields and ultrafine particles in human Mono Mac 6 cells". *Toxicol Lett*, 161:73-82. 2006.
- Simon M.M., Reikerstorfer A., Schwarz A., Krone C., Luger T A. "Heat shock protein 70 overexpression affects the response to ultraviolet light in murine fibroblasts. Evidence for increased cell viability and suppression of cytokine release". *J Clin Invest*, 95: 926- 933. 1995.
- Simone V.C., Carlos H.L., José R.F., Ana P.R.R. "Heat shock protein Hsp70: structure and action in response to cellular stress". *Acta Veterinaria Brasilica*, 7: 261-271. 2013.
- Slater A., Nobel S., van den Dobbelsteen D., Orrenius S., "Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis". *Toxicol. Lett.*, 82/83: 149-153. 1995.
- Somero G.N. "Protein and temperature". *Annu Rev Physiol*, 57: 43-68. 1995.
- Sinotova O.A., Novoselova E.G., Glushkova O.V., Fesenko E.E. "A comparison of the effects of millimeter and centimeter waves on tumor necrosis factor production in mouse cells". *Biofizika*, 49:545-50. 2004



- Stagg R.B., Thomas W.J., Jones R.A., Adey W.R. "DNA synthesis and cell proliferation in C6 glioma and primary glial cells exposed to a 836.55 MHz modulated radiofrequency Cell". *Bioelectromagnetics* 18:230-236. 1997.
- Stankiewicz W., Dabrowski M.P., Kubacki R., Sobiczewska E., Szmigielski S. "Immunotropic influence of 900 MHz microwave GSM signal on human blood immune cells activated in vitro. *Electromagn Biol Med.* 25:45-51. 2006.
- Stern S., Margolin L., Weiss B., Lu S., and M. Michaelson S., "Microwaves effects on thermoregulatory behavior in rats." *Science*, 206: 198– 201, 1979.
- Swicord M., Morrissey J., Zakharia D., Ballen M., Balzano Q. "Dosimetry in mice exposed to 1.6 GHz microwaves in a carousel irradiator". *Bioelectromagnetics*, 20:42-7. 1999.
- Sykes P.J., McCallum B.D., Bangay M.J., Hooker A.M., Morley A.A. "Effect of exposure to 900 MHz radiofrequency radiation on intrachromosomal recombination in pKZ1 mice". *Radiat Res.*, 156: 495-502. 2001.
- Tavaria M., Gabriele T., Kola I., Anderson R.L. "A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family". *Cell Stress Chaperones*, 1: 23-28. 1996.
- Taylor D.M., Tradewell M.L., Minotti S., Durham H.D. "Characterizing the role of Hsp90 in production of heat shock in motor neurons reveals a suppressive effect of wild-type Hsf1". *Cell Stress Chaperones*, 12: 151-162. 2007.
- Thomas S., Kühnlein A., Heinrich S, Praml G., Nowak D., von Kries R., Radon K. "Personal exposure to mobile phone frequencies and well-being in adults: A cross-sectional study based on dosimetry", *Bioelectromagnetics*, 29: 463-470. 2008a.
- Thomas S., Kühnlein A., Heinrich S., Praml G., Von Kries R., Radon K., "Exposure to mobile telecommunication networks assessed using personal dosimetry and well-being in children and adolescents: The German mobile study". *Environ Health.* 2008b.
- Tice R.R., Hook G.G., Donner M., McRee D.I., Guy A.W., Genotoxicity of radiofrequency signals. I. Investigation of DNA damage and micronuclei induction in cultured human blood cells, *Bioelectromagnetics* 23: 113–126. 2002.

- Tipping D.R., Chapman K.E., Birley A.J., Anderson M. "Observations on the effects of low frequency electromagnetic fields on cellular transcription in *Drosophila* larvae reared in field-free conditions". *Bioelectromagnetics*, 20:129-31. 1999.
- Tomoyuki S., Norio I., Jianqing W., Satoru T., Mayumi, Osamu F. "Multigenerational Effects of Whole Body Exposure to 2.14 GHz W-CDMA Cellular Phone Signals on Brain Function in Rats". *Bioelectromagnetics* 35:497-511. 2014.
- Tournier C., Hess P., Yang D.D., Xuj., Turner T.K., Nimnual A., Bar-Sagi D., Jones S.N., Flavell R.A., Davis R.J. "Requirement of JNK for stressinduced activation of the cytochrome c-mediated death pathway". *Science*, 288: 870-874. 2000.
- Trelles M.A., van der Lugt C., Mordon S., Ribé A., Al-Zarouni M. "Histological findings in adipocytes when cellulite is treated with a variable-emission radio frequencysystem". *Lasers Med Sci.*, 25: 191-5. 2009.
- Tsuji H., Larson M.G., Venditti F.J. Jr, Manders E.S., Evans J.C., Feldman C.L., Levy D. "Impact of reduced heart rate variability on risk for cardiac events. The Framingham heart study." *Circulation*, 94: 2850-2855. 1996.
- Tuschl H., Novak W., Molla-Djafari H.. "In vitro effects of GSM modulated radiofrequency fields on human immune cells". *Bioelectromagnetics*, 27:188-196. 2006
- Umarao P., Bose S., Bhattacharyya S., Kumar A., Jain S. "Neuroprotective Potential of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Along with Exposure to Electromagnetic Field in 6-OHDA Rat Model of Parkinson's Disease". *J Nanosci. Nanotechnol.*, 16:261-269. 2016.
- Valbonesi P, Franzellitti S, Bersani F, Contin A, Fabbri E. "Effects of the exposure to intermittent 1.8 GHz radio frequency electromagnetic fields on HSP70 expression and MAPK signaling pathways in PC12 cells". *Int J Radiat Biol.*, 90:382-391. 2014.
- Van Bergen en Henegouven P.M., Berbers G., Linnemans W.A., Van Wijk. "Subcellular localization of the 84,000 dalton heat-shock protein in mouse neuroblastoma cells: evidence for a cytoplasmatic and nuclear localization". *Eur J Cell Biol.*, 43: 469-478. 1987.
- Van Faassen E.E., Bahrami S., Feelisch M., Hogg N., Kelm M., Kim-Shapiro D.B., Kozlov A.V., Li H., Lundberg J.O., Mason R., Nohl



- H., Rassaf T., Samouilov A., Slama-Schwok A., Shiva S., Vanin A.F., Weitzberg E., Zweier J., Gladwin M.T. "Nitrite as regulator of hypoxic signaling in mammalian physiology". *Med Res Rev.*, 29:683-741.2009.
- Van Faassen E.E., Vanin A. "Radicals for life: The various forms of nitric oxide". Elsevier. 2007.
- Van Leeuwen G.M., Lagendijk J.J., Van Leersum B.J., Zwamborn A.P., Hornsleth S.N., Kotte A.N. "Calculation of change in brain temperatures due to exposure to a mobile phone". *Phys Med Biol*, 44: 2367-2379. 1999.
- Verginadis I.I., Simos Y.V., Velapoulou A.P., Vadalouca A.N., Kalfakakou V.P., Karkabounas S.Ch., Evangelou A.M. "Analgesic effect of the electromagnetic resonant frequencies derived from the NMR spectrum of morphine". *Electromagn Biol Med.*, 31:275-84. 2012.
- Villarini M, Ambrosini MV, Moretti M, Dominici L, Taha E, Piobbico D, Gambelungho C, Mariucci G. "Brain Hsp70 expression and DNA damage in mice exposed to extremely low frequency magnetic fields: a dose-response study". *Int J Radiat Biol.*, 89:562-570. 2013.
- Vukova T., Atanassov A., Ivanov V. "Intensity-dependent effects of microwave electromagnetic fields on acetylcholinesterase activity and protein conformation in frog skeletal muscles", *Med Sci Monit.*, 11: 50-6. 2005.
- Wainwright P. "Thermal effects of radiation from cellular telephones". *Phys Med Biol*. 45: 2363-2372. 2000.
- Walters J., Pop C., Scott F.L., Drag M., Swartz P., Mattos C., Salvesen G.S., Clark A.C. "A constitutively active and uninhibitable caspase-3 zymogen efficiently induces apoptosis". *The Biochem J*, 424: 335-45. 2009.
- Wang J., Fujiwara O. "FDTD Computation of temperature rise in the human head for portable telephones". *IEEE Trans. on Microwave Theory and Tech.*, 47: 1528-1534. 1999.
- Wang J., Koyama S., Komatsubara Y., Suzuki Y., Taki M., Miyakoshi J. Effects of a 2450 MHz high-frequency electromagnetic field with a wide range of SARs on the induction of heat-shock proteins in A172 cells. *Bioelectromagnetics* 27:479-486. 2006.

- Watilliaux A., Edeline J.M., Lévêque P., Jay T.M., Mallat M. "Effect of exposure to 1,800 MHz electromagnetic fields on heat shock proteins and glial cells in the brain of developing rats". *Neurotox Res.*, 20:109-119. 2010.
- Watson J.M., Parrish E.A., Rinehart C.A. "Selective potentiation of gynecologic cancer cell growth in vitro by electromagnetic fields". *Gynec Oncol*, 71: 64-71. 1998.
- Waza M., Adachi H., Katsuno M., Minamiyama M., Tanaka F., Doyu M., Sobue G. "Modulation of Hsp90 function in neurodegenerative disorders: a molecular-targeted therapy against disease-causing protein". *J Mol Med.*, 84: 635-646. 2006.
- Wei J., Tong J., Yu L., Zhang J. "EMF protects cardiomyocytes against hypoxia-induced injury via heat shock protein 70 activation". *Chem Biol Interact.*, 248:8-17. 2016.
- Wei Y., Xiaolin H., Tao S. "Effects of extremely low-frequency-pulsed electromagnetic field on different-derived osteoblast-like cells". *Electromagn Biol Med.*, 27:298-311. 2008.
- Welch W.J. "Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease". *Physiol Rev*, 72: 1063-1081. 1992.
- Wyatt S., Mailhos C., Latchman D.S. "Trigeminal ganglion neurons are protected by the heat shock proteins HSP70 and HSP90 from thermal stress but not from programmed cell death following nerve growth factor withdrawal". *Brain Res Molecular*. 39: 52-56. 1996.
- Wynn R.M., Davie J.R., Cox R.P., Chuang D.T. "Molecular chaperones: heat-shock proteins, foldases and matchmakers". *J Lab Clin Med*, 24: 31-36. 1994.
- Xing F., Zhan Q., He Y., Cui J., He S., Wang G. "1800MHz Microwave Induces p53 and p53-Mediated Caspase-3 Activation Leading to Cell Apoptosis In Vitro". *PLoS One*, 11:e0163935. 2016.
- Yang L.L., Zhou Y., Tian W.D., Li H.J., Kang-Chu-Li, Miao X., An G.Z., Wang X.W., Guo G.Z., Ding G.R.. "Electromagnetic pulse activated brain microglia via the p38 MAPK pathway". *Neurotoxicology*. 52:144-149. 2016.
- Yang X., He G., Hao Y., Chen C., Li M., Wang Y., Zhang G., Yu Z. "The role of the JAK2- STAT3 pathway in pro-inflammatory responses of EMF-stimulated N9 microglial cells". *J Neuroinflamm* 7: 54. 2010.

- Yang X.S., He G.L., Hao Y.T., Xiao Y., Chen C.H., Zhang G.B., Yu Z.P. "Exposure to 2.45 GHz electromagnetic fields elicits an HSP-related stress response in rat hippocampus". *Brain Res Bull.*, 88:371-378. 2012.
- Yariktas M., Doner F., Ozguner F., Gokalp O., Dogru H., Delibas N. "Nitric oxide level in the nasal and sinus mucosa after exposure to electromagnetic field". *Otolaryngol Head Neck Surg*, 132:713-716. 2005.
- Yi X., Luk J.M., Lee N.P., Peng J., Leng X., Guan X.Y., Lau G.K., Beretta L., Fan S.T. "Association of Mortalin (HSPA9) with liver cancer metastasis and prediction for early tumor recurrence". *Mol Cell Proteomics*, 7: 315-325. 2008.
- Yilmaz F., Dasdag S., Akdag M.Z., Kilinc N. "Whole-body exposure of radiation emitted from 900 MHz mobile phones does not seem to affect the levels of anti-apoptotic bcl-2 protein". *Electromagn Biol Med.*, 27: 65-72. 2008.
- Zafra C., Peña J., de la Fuente M. "Effect of microwaves on the activity of murine macrophages in vitro". *International Archives of Allergy Appl Immunol*, 85:478-482. 1988.
- Zhao T.Y., Zou S.P., Knapp P.E. "Exposure to cell phone radiation up-regulates apoptosis genes in primary cultures of neurons and astrocytes". *Neurosci. Lett.*, 1:34-8. 2006.
- Zhang Z.Y., Zhang J., Yang C.J., Lian H.Y., Yu H., Huang X.M., Cai P. "Coupling Mechanism of Electromagnetic Field and Thermal Stress on *Drosophila melanogaster*". *PLoS One*, 11:e0162675. 2016.
- Zou J., Chen Y., Qian J., Yang H. "Effect of a low-frequency pulsed electromagnetic field on expression and secretion of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in nucleus pulposus cells". *J Int Med Res.*, 5:462-470. 2017.
- Zuo H., Lin T., Wang D., Peng R., Wang S., Gao Y., Xu X., Li Y., Wang S., Zhao L., Wang L., Zhou H. "Neural cell apoptosis induced by microwave exposure through mitochondria-dependent caspase-3 pathway". *Int J Med Sci.*, 11:426-35. 2014.
- Zuo H., Lin T., Wang D., Peng R., Wang S., Gao Y., Xu X., Zhao L., Wang S., Su Z. "RKIP Regulates Neural Cell Apoptosis Induced by Exposure to Microwave Radiation Partly Through the MEK/ERK/CREB Pathway". *Mol Neurobiol*, 51: 1520-1529. 2015.



## ANEXO I

### Abreviaturas:

ADN – Ácido Desoxirribonucleico  
ADNc – ADN complementario  
ARN – Ácido Ribonucleico  
ARNm – ARN mensajero  
ACT –  $\beta$ -actina  
°C – grados centígrados  
Ca<sup>+</sup> – Calcio  
CASP3 – Caspasa-3  
CDMA – del inglés Code Division Multiple Access  
CEM – Campos electromagnéticos  
DAPI – 4',6-diamino-2-fenilindol  
DEM – Desviación estándar de la media  
EDTA – Ácido etilendiaminotetraacético  
ELISA – del inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay  
EM – electromagnética/s  
E<sub>m</sub> – medida de la intensidad de campo eléctrico  
eV – electronvoltio  
GTEM – gigahertz transverse electromagnetic cell  
GHz – Megahercios  
GSM – del inglés Global System for Mobile communications  
FDTD – del inglés Finite Difference Time Domain  
HE – Hematoxilina-Eosina  
Hsp – del inglés Heat shock protein  
Hz – Hercios  
IARC – del inglés International Agency for Research on Cancer  
ICNIRP – del inglés International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection  
IL – Interleuquina  
IUPAC – del inglés International Union of Pure and Applied Chemistry  
kDa – Kilodalton

KHz – Kilohercios  
MHZ – Megahercios  
Min – minuto  
NADPH – Nicotinamida Adenina Dinucleótido fosfato  
NO – del inglés nitric oxyde  
NOS – del inglés nitric oxyde synthase  
nNOS – neuronal nitric oxyde synthase  
eNOS – endothelial nitric oxyde synthase  
iNOS – inducible nitric oxyde synthase  
OMS – Organización Mundial de la Salud  
PBS – del inglés Phosphate Buffered Saline  
PCR – del inglés polymerase chain reaction  
rtPCR – del inglés real time PCR  
qPCR – del inglés quantitative PCR  
PD – densidad de potencia incidente  
P<sub>TR</sub> – Potencia transmitida  
RF – Radiofrecuencia/s  
RG – Receptores de Glucocorticoides  
ROS – del inglés reactive oxygen species  
r.p.m. – revoluciones por minuto  
SAR – Tasa de Absorción Específica (del inglés Especific Absortion Rate)  
SFB – Suero Bovino Fetal  
SNC – Sistema Nervioso Central  
TEM – del inglés transverse electromagnetic mode  
TBS – del inglés Tris-buffered saline  
TNF – del inglés tumor necrosis factor  
TNFR – del inglés tumor necrosis factor receptor  
TRADD – del inglés TNFR-Adopter protein vía Death Domain  
μT – microtesla  
WCDMA – del inglés Wideband Code Division Multiple Access

## ANEXO II

XUNTA DE GALICIA EDIFICIO ADMINISTRATIVO REXISTRO XERAL - LUGO
19 XULL. 2011
<b>ENTRADA</b>
Nº

Lugo, 18 de xullo de 2011


Adxunto remito a solicitude de un novο procedemento de investigación con animais de experimentación: correspondente a:

Centro: **Animalario da Facultade de Medicina (15005AE)**

Investigadora: **Elena López Martín**

Procedemento: **Estudio de los efectos de la interacción de múltiples Radiofrecuencias en la rata**

Código: **15005AE / 11 / FUN.01 / BIOL.AN.08 / ELM2**

P. O. 

**Ana María López Beceiro**

Supervisora das instalacións de experimentación, cría e subministro de animais de laboratorio da Universidade de Santiago de Compostela

**XEFE DO SERVIZO DE GANDERÍA**

Delegación Territorial da Consellería do Medio Rural  
Edificio Administrativo Monelos  
Praza de Luis Seoane s/n  
15071 A Coruña





## ANEXO III

**Certificado de reconocimiento de la capacitación para manejar animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. Orden ECC 566/2015, de 20 de marzo**

D./D.ª **ALBERTO LÓPEZ FURELOS**, con N.I.F. **44825441M**, ha obtenido el reconocimiento de la capacitación para realizar, sin limitación de especie, las funciones de:

CUIDADO DE LOS ANIMALES

EUTANASIA DE LOS ANIMALES

REALIZACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS

**Nº de certificado: CAP-T-0722-15**

**ORGANISMO QUE EXPIDE EL CERTIFICADO**

Dirección General de Agricultura y Ganadería

Consejería de Medio Ambiente, Administración Local y Ordenación del Territorio

El reconocimiento de la capacitación para la realización de las funciones relacionadas en este certificado surtirá efecto en todo el territorio nacional.

**Fecha**

13 de octubre de 2015

**Sello**



**Nombre y firma**

EL DIRECTOR GENERAL DE AGRICULTURA Y GANADERÍA

Fdo.: José Luis Sanz Vicente



## ANEXO IV

Producción científica de Alberto López Furelos

### ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

López-Furelos A, Salas-Sánchez AA, Ares-Pena FJ, Leiro-Vidal JM, López-Martín “**Exposure to radiation from single or combined radio frequencies provokes macrophage dysfunction in the RAW 264.7 cell line**”. Int J Radiat Biol., 30, pp. 1-12 2018

López-Furelos A; Leiro-Vidal JM; Ares-Pena FJ; Salas-Sánchez AA; López-Martín ME. “**Evidence of cellular stress and caspase-3 resulting from a combined two-frequency signal in the cerebrum and cerebellum of sprague-dawley rats**”. Oncotarget, 40, pp. 64674-64689. 2016.

López Furelos A.; Miñana Maiques M. M.; Leiro J. M.; Rodríguez-Gonzalez J. A.; Ares-Pena F. J.; Lopez-Martin E. “**An experimental multi-frequency system for studying dosimetry and acute effects on cell and nuclear morphology in rat tissues**”. PIER, 129, pp. 541-558. 2012.

### Artículos en revisión

Othman H., López-Furelos A., Leiro Vidal J.M., Ammari M.; Sakly M., Abdelmelek H., Ares-Pena F.J.; Lopez-Martin M.E. “**Exposure to 2.45 GHz radiation triggers changes in HSP-70, glucocorticoid receptors and GFAP biomarkers in rat brain**”. Biomedicine & Pharmacotherapy. *Enviado 22/05/2018*

Salas-Sánchez A.A., López-Furelos A., Rodríguez-González J.A., López-Martín M.E., Ares-Pena F.J. **“In Vivo Studies on the Effects of Electromagnetic Fields”**. IEEE TAP. *Enviado 23/03/2018*

## **CAPÍTULOS DE LIBROS.**

Lopez-Martin E, Salas-Sánchez AÁ, López-Furelos A, Jorge-Barreiro FJ, Moreno-Piquero E and Ares-Pena FJ. **“The calculation of dosimetry in small animals combining the FDTD method and experimental measures: application of three radiation systems”**. Radioactive wastes and exposure, pp. 127-145 Nova. 2017

## **TRABAJOS PRESENTADOS EN CONGRESOS.**

### **Nacionales**

**Título del trabajo:** Validación del protocolo experimental de radiación para la línea celular RAW 264.7 con frecuencias combinadas en la cámara GETM.

**Nombre del congreso:** XXXI. Simposium Nacional de la Unión Científica Internacional de Radio, URSI 2016.

**Ciudad de celebración:** Madrid, España

**Autores:** Alberto López-Furelos; José M. Leiro-Vidal; Aarón A. Salas-Sánchez; Juan A. Rodríguez-González; Francisco J. Ares-Pena; Elena López-Martín.

**Título del trabajo:** Calculo de la dosimetría en animales pequeños combinando el método de FDTD y las medidas experimentales: Aplicación para tres sistemas de radiación.

**Nombre del congreso:** XXX. Simposium Nacional de la Unión Científica Internacional de Radio, URSI 2015

**Ciudad de celebración:** Navarra, España

**Autores:** María.Elena López Martín, Alberto López Furelos; Aaron Angel Salas-Sánchez; Eduardo Moreno Piquero; Francisco J. Ares Pena.

**Título del trabajo:** Dosimetría y efectos biológicos en el cerebro de rata por exposición multifrecuencia en una cámara GTEM

**Nombre del congreso:** XXIX Symposium Nacional de la Unión Científica Internacional de Radio

**Ciudad de celebración:** Valencia, España

**Autores:** Alberto López Furelos; José Manuel Leiro; Aaron Angel Salas-Sánchez; Juan A. Rodríguez González; Francisco J. Ares Pena; María Elena López Martín.

**Título del trabajo:** Estudio de dosimetría y estrés tisular en rata tras la exposición a un sistema de radiación multifrecuencias

**Nombre del congreso:** XXVIII Symposium Nacional de la Unión Científica Internacional de Radio

**Ciudad de celebración:** Santiago de Compostela, España

**Autores:** Alberto López Furelos; José Manuel Leiro; Eduardo Moreno Piquero; Juan A. Rodríguez; Francisco J. Ares Pena; María Elena López Martín.

## **Internacionales**

**Título del trabajo:** Multiple Simultaneous Exposures to Electromagnetic Signals Induce Changes in Heat Shock Proteins and Caspase 3 on the Rat Brain Hemispheres

**Nombre del congreso:** international conference URSI AT-RASC 2015

**Ciudad de celebración:** Gran Canaria, España

**Autores:** Alberto López-Furelos; José M. Leiro-Vidal; Aarón A. Salas-Sánchez; Juan A. Rodríguez-González; Francisco J. Ares-Pena; Elena López-Martín.

**Título del trabajo:** An Experimental Multi-Frequency System for Studying Dosimetry and Acute Effects on Cell and Nuclear Morphology in Rat Tissues

**Nombre del congreso:** European Conference on Antennas on propagation

**Ciudad de celebración:** Gothenburg, Suecia

**Autores:** A. López-Furelos; M. M. Miñana-Maiques; J. M. Leiro; J. A. Rodríguez-González; F. J. Ares-Pena; E. López-Martín.